

Jenni Kujala

Transkriptiotekijä MAL:n ja tumalevyproteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen immu- nosaostusmenetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

29.11.2016

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Jenni Kujala Transkriptiotekijä MAL:n ja tumalevyproteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen immunosaostusmenetelmällä 37 sivua + 1 liite 29.11.2016
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Maria Vartiainen, Tutkimusryhmänjohtaja Ekaterina Sidorenko, Väitöskirjaopiskelija Tiina Soininen, Lehtori
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää transkriptiotekijä MAL:n ja hiiren tumalevyproteiinien (Lamiini B -reseptori LBR, Laminaan sitoutuva polypeptidi-2 Lap2 ja emeriini) välillä olevasta mahdollisesta vuorovaikutuksesta immunosaostusmenetelmällä. Projekti tehtiin yhdessä väitöskirjatutkijan kanssa Helsingin yliopiston Biotekniikan Instituutissa Maria Vartiaisen johtamassa kansainvälisessä tutkimusryhmässä.</p> <p>Projekti aloitettiin monistamalla spesifisillä alukkeilla hiiren geeniä, joka tuottaa tuman sisemmälle membraanikalvolle kiinnittymätöntä proteiinin osaa Lap2E:sta eli aminohappoja 1-409. Insertti liitettiin pENTR/D-TOPO-kloonausmenetelmällä TOPO-vektoriin. Menetelmällä saatu pENTR liitettiin HA- ja FLAG-destinaatiovektoreihin Gateway-kloonauksella. Muut tutkittavat tumalevyproteiinit sekä projektissa käytetty transkriptiotekijä MAL ja sen muunnelmat (MAL-NLS, MAL^{***}, RPEL ja MALΔRPEL) löytyivät jo ryhmän käytöstä. Tutkittavia proteiineja tuottavat plasmidit transfektoitiin jetPRIME-reagenssilla hiiren alkioista alunperin eristettyyn jatkuvaan solulinjaan NIH/3T3-fibroblastisoluihin. Ilmenemistason määrittämisellä huomattiin, että solut eivät kyenneet tuottamaan samalla tasolla muokattuja tumalevyproteiineja verrattuna niiden täyspitkiin muotoihin. Solujen värjäyksellä saatiin lisätietoa proteiinien sijoittumisesta soluissa. Transmembraanidomeenin puuttuminen muokatuilla tumalevyproteiineilla mahdollisti niiden sijoittumisen tumaan.</p> <p>Immunosaostusmenetelmällä tutkittiin tumalevyproteiinien ja MAL:n välistä vuorovaikutusta. Lap2E- ja LBR-proteiinien välisestä vuorovaikutuksesta transkriptiotekijä MAL:n kanssa ei voida näiden tutkimuksien perusteella sanoa mitään. Niiden ilmenemistasoa soluissa pitäisi saada kasvatettua, jotta vuorovaikutusta voitaisiin kunnolla tutkia. Emeriinin ja MAL:n välillä havaittiin kuitenkin vuorovaikutusta, kun agaroosihelmien avulla kiinnitettiin ensin emeriini ja tutkittiin MAL:n kiinnittymistä emeriiniin. Toisinpäin vuorovaikutusta ei kuitenkaan havaittu.</p> <p>Immunosaostus menetelmänä on haastava ja monivaiheinen. Analyysit pitäisi toistaa useaan kertaan samoissa olosuhteissa ja saada samanlaisia tuloksia, jotta vuorovaikutuksesta voitaisiin olla varmoja. Massaspektrometrillä ja immunosaostuksella saadut vihjeet osoittavat kuitenkin, että vuorovaikutusta proteiinien välillä saattaa olla.</p>	
Avainsanat	MAL, Tumalevyproteiini, LBR, Lap2, emeriini

Author Title Number of Pages Date	Jenni Kujala Interaction between Transcription Factor MAL and Lamina Proteins by Immunoprecipitation Method 37 pages + 1 appendice 29 November 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Maria Vartiainen, Group leader, Docent Ekaterina Sidorenko, PhD student Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The aim of the project was to study interactions between transcription factor MAL and lamina proteins (Lamin B receptor LBR, Lamina-associated polypeptide Lap2 and emerin) by co-immunoprecipitation. The project was done together PhD student in Maria Vartiainen's international research group at the Institute of Biotechnology. It is an independent research institute at the University of Helsinki.</p> <p>The project started with amplifying with specific primers the sequence encoding amino acids 1-409 from Lap2 mouse gene. This produces a protein that is not attached to the inner nuclear membrane. Insert was cloned to TOPO-vector using pENTR/D-TOPO cloning kit. The inserts were subsequently cloned into HA- and FLAG-destination vectors using Gateway cloning kit. Other lamina proteins, as well as MAL and its different constructs (MAL-NLS, MAL^{***}, RPEL and MALΔRPEL), were already available in the group. All proteins were produced from mouse genes and were grown in mouse fibroblast NIH/3T3 cells. Plasmids expressing the proteins of interest were transfected to NIH/3T3 fibroblast cells with jetPRIME-reagent.</p> <p>Test expression of the proteins showed that cells cannot express truncated versions of the lamina proteins (Lap2 and LBR) at the same level as their full length versions. Information about protein localization was gained with cell staining. The absence of the transmembrane domain in truncated versions of proteins allowed placement of proteins inside the nucleus.</p> <p>Interactions between lamina proteins and MAL were studied by co-immunoprecipitation. Interaction between Lap2 and LBR with MAL did not give any results because of their low expression level in cells. However, interaction between emerin and MAL-NLS was detected.</p> <p>This method is complicated and has many different steps which increases the risk of wrong results. To be sure about the interactions between studied proteins, the experiments should be repeated several times. Nonetheless, the data of mass spectrometry and co-immunoprecipitation showed that there might be interactions between these proteins.</p>	
Keywords	MAL, lamina proteins, LBR, Lap2, emerin

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	1
2.1	MAL-proteiini	1
2.2	Tumalevyn proteiinit	5
2.3	Proteiinien välinen vuorovaikutus	6
3	Menetelmien taustat	7
3.1	TOPO-kloonaus pENTR/D-TOPO-kloonausmenetelmällä	7
3.2	Gateway-kloonaus Gateway LR clonase II Enzyme mix -kitin avulla	9
3.3	Immunosaostus	10
4	Työn suoritus	11
4.1	Lap2 ϵ (1-409)-proteiinia tuottavan plasmidin valmistus	12
4.2	Proteiinien tuotto NIH/3T3-soluissa	14
4.3	Laminaproteiinien ilmentymistason määrittäminen	15
4.4	Solujen värjäys	15
4.5	Lap2 ϵ :n ja emeriinin transfektio NIH/3T3-soluihin MAL:n kanssa	16
4.6	Immunosaostus	18
5	Tulokset	20
5.1	Lap2 ϵ (1-409):n TOPO-Kloonaus	20
5.2	Gateway-kloonaus	21
5.3	Proteiinien ilmenemistason määrittäminen	22
5.4	Solujen värjäyksen fluoresenssimikroskooppikuvat	23
5.5	Immunosaostuksen Western blot -tulokset	26
5.5.1	Lap2 ϵ -proteiinin vuorovaikutuksen tutkiminen NLS-MAL-proteiinin kanssa	27
5.5.2	Emeriinin ja MAL:in välinen vuorovaikutus	29
6	Yhteenveto	32

Liitteet

Liite 1. Projektissa käytettyjen liuosten reseptit

Lyhenteet ja käsitteet

Adheesio	Solujen välinen vuorovaikutus niiden tarttumismolekyylien avulla
Apoptoosi	Ohjelmoitu solukuolema
B1 Basic box	MAL-proteiinin toiminnallinen alue, jonka avulla SRF:n kiinnittyminen tapahtuu
c-fos	Varhaisgeeni
DMEM	Solujen elatusaine (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
Domeeni	Proteiinien rakenteellisesti erottuva alue, jolla usein toiminnallinen erikoistehtävä
Emd	Emeriini, Tumalevyn proteiini
F-aktiini	Aktiinisäikeet
G-aktiini	Aktiinimonomeerit
HA	Hemagglutiniini, antigeeninen glykoproteiini, joka on löydetty influenssaviruksen pinnoilta
Input-näyte	Solulysaatti, joka sisältää kaikki solussa ilmenevät proteiinit
IP-näyte	Näytteet, jotka sisältävät vain immunosaostuksella erotetut proteiinit ja niiden kompleksit
Konfluenssi	Solutiheys
Koaktivaattori	Proteiini, joka sitoutumalla geenin toiminta-alueelle aktivoi sen luentaa

Lap2	Laminaan sitoutuva polypeptidi 2 (Lamina-associated polypeptide 2)
LBR	Lamiini B -reseptori (lamin B receptor)
LZ	MAL:n toiminnallinen alue, joka välittää eri MRTF-proteiinien sitoutumista toisiinsa, (leuzine zipper)
MAL	proteiini, joka kuuluu myokardiininkaltaisiin transkriptiotekijöihin
MAL-NLS-FLAG	MAL-NLS-FLAG sisältää tumalokalisaatiosekvenssin
MAL ^{***} -FLAG	MAL ^{***} -FLAG-plasmidissa on pistemutaatio sen jokaisessa RPEL-motiivissa
MAL Δ RPEL-FLAG	MAL Δ RPEL-FLAG-plasmidissa RPEL-motiivi puuttuu
MKL-1	MAL:in vaihtoehtoinen nimitys
Motiivi	Lyhyt, jollekin piirteelle ominainen sekvenssijakso tai rakennekomponentti
MRTF	Myokardiinin kaltainen transkriptiotekijä (Myocardin related transcription factor)
MRTF-A	MAL:in vaihtoehtoinen nimitys
NIH/3T3-solut	Hiiren alkioista alun perin eristetty jatkuva solulinja
NLS	Tumalokalisaatiosekvenssi (nuclear localization signal)
Q-alue	SRF:n kiinnittyminen tapahtuu MAL:in Q-alueen avulla (Glutamine rich stretch)
RPEL-FLAG	RPEL-FLAG-plasmidi sisältää vain aktiinia sitovan RPEL-domeenin

SAP-alue	MAL:n toiminnallinen alue, joka osallistuu DNA:n sitomiseen
SDS-Page	Proteiinien erotteluun koon perusteella käytettävä tekniikka, Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
SRF	Seerumi responsiivinen tekijä (Serum response factor)
TAD-domeeni	MAL:in domeeni, jota tarvitaan SRF:n aktivoimiseen (Trans-activation domain)
Transkriptiotekijä	Proteiini, joka kiinnittymällä DNA:n säätelyjaksoihin säätelee DNA:n kopioimista lähetti-RNA:ksi

1 Johdanto

Opinnäytetyö perustuu projektiin, joka tehtiin keväällä 2016 Helsingin yliopiston Biotekniikan Instituutissa Maria Vartiaisen johtamassa tutkimusryhmässä yhdessä väitöskirjaopiskelija Ekaterina Sidorenkon kanssa. Kansainvälinen solu- ja molekyylibiologian alan tutkimusryhmä tutkii aktiinin roolia tuman organisaation ja geenien ilmentymisen säätelijänä. Projekti perustuu tutkimusryhmässä aikaisemmin massaspektrometrilla saatuun julkaisemattomaan tulokseen tumalevyn proteiinien ja transkriptiotekijä MAL:n välillä olevasta mahdollisesta vuorovaikutuksesta. Tämän projektin tavoitteena oli selvittää tumalevyproteiinien (Lap2 ϵ , LBR ja emeriini) ja kyseisen transkriptiotekijän välistä vuorovaikutusta immunosaostusmenetelmällä. Tutkittavista proteiineista hiiren laminaan sitoutuvaa polypeptidi 2:sta (lamina-associated polypeptide 2, Lap2) sekä Lamiini B -reseptorista (lamin B receptor, LBR) käytettiin myös niiden muokattuja versioita. Näistä puuttui tuman sisemmälle kalvolle sitoutuva alue. Aikaisemmat tutkimukset ovat antaneet viitteitä, että kyseinen alue sitoutuisi epäspesifisesti immunosaostuksessa käytettäviin agarosihelmiin. Kaikkia tutkittavia proteiineja tuotettiin hiiren geeneistä NIH/3T3-soluissa, mikä on hiiren alkioista alun perin eristetty jatkuva solulinja.

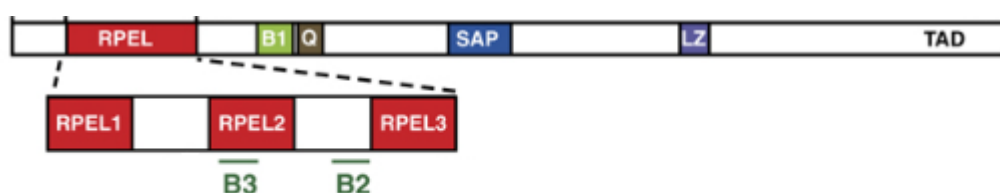
2 Teoria

Transkriptiotekijät ovat aitotumallisten eli eukaryoottisolujen proteiineja, jotka tunnistavat DNA:ssa promootorialueita ja tehostajia. Sitoutumalla DNA:n säätelyjaksoihin faktorit säätelevät DNA:n kopioimista lähetti-RNA:ksi. Muut proteiinit, kuten koaktivaattorit, voivat säädellä transkriptiotekijöiden aktiivisuutta. [1.]

2.1 MAL-proteiini

MAL on proteiini, joka kuuluu myokardiinin kaltaisiin transkriptiotekijöihin (myocardin related transcription factor, MRTF). Ne säätelevät useiden eri geenien ilmentymistä. Proteiini tunnetaan myös nimellä MKL1 ja MRTF-A. [2.] MAL on seerumiresponsiivisen tekijän (serum response factor, SRF) koaktivaattori eli kiinnittymällä SRF:n DNA:ta sitovaan domeeniin se aktivoi geenien luentaa. SRF-tekijää tarvitaan solujen normaaliin kehitykseen. Se stimuloi solujen lisääntymistä ja erilaistumista sekä säätelee useiden varhaisgeenien, kuten *c-fos* aktiivisuutta. [3.]

MAL:ia ilmennetään useissa erilaisissa soluissa ja se on rikastunut mesenkymaalisissa sekä lihas- ja epiteelisoluissa [4]. Sillä on myös hyvin tärkeä rooli solujen liikkumisessa ja adheesiossa [5]. Kuvassa 1 on kuvattu MAL:n toiminnalliset alueet. Proteiinin N-terminus sisältää kolme RPEL-motiivia, joiden tehtävä on sitoa G-aktiinia eli aktiinin monomeereja. SRF:n kiinnittyminen tapahtuu B1- (basic box) sekä Q- (glutamine rich stretch) alueiden avulla. Proteiinin tumaan kulkeutuminen tapahtuu proteiinin B1- ja B2-alueiden avulla. SAP-alue osallistuu DNA:n sitomiseen ja LZ (leuzine zipper) välittää eri MRTF-proteiinien sitoutumista toisiinsa. TAD-domeenia (transactivation domain) tarvitaan SRF:n aktivoimiseen. [6.]



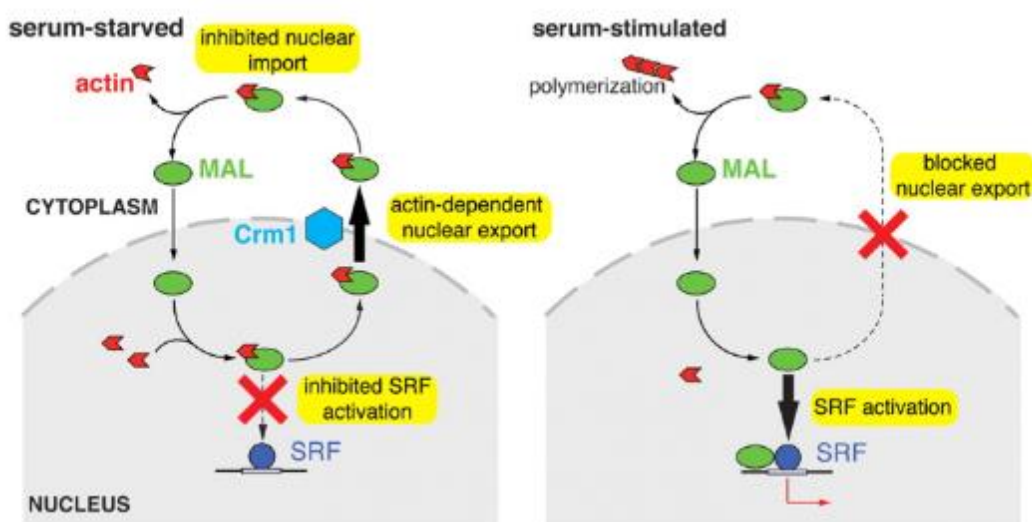
Kuva 1 MAL-proteiinin toiminnalliset alueet [6]

MAL- ja SRF-proteiinit yhdessä säätelevät erityisesti aktiinisäikeiden muodostumiseen vaikuttavien geenien ilmentymistä sekä kokoonpanoa. Ne vaikuttavat myös solujen väliin ja solu-soluväliaine välisiin kiinnittymiin. Myös solun liikkuminen sekä mikrotubulusten dynamiikka on näiden proteiinien säätelemien geenien ohjaamaa. [5.]

Transkriptiotekijä MAL välittää signaaleja solulimasta tuman SRF:lle. MAL-proteiinia säädellään erityisesti aktiinin dynamiikan avulla. Aktiini tunnetaan solun tukirangan komponenttina ja se osallistuu myös geenien ilmentymisen kontrolloimiseen. Sen on osoitettu säätelevän esimerkiksi MAL:n kulkemista soluliman ja tuman välillä. [2.] Aktiinisäikeet (F-aktiini) muodostuvat aktiinimonomeereista (G-aktiini). Pienet Rho-ryhmään kuuluvat GTP:tä sitovat entsyymit saavat aikaan aktiinin polymerisoitumisen. Nämä entsyymit välittävät signaaleja soluissa kalvoon sitoutuneista reseptoreista aktiinitukirankaan. Vähentynyt aktiinien monomeerimäärä aktivoi SRF:n MAL:n välityksellä. [2, s.12.]

Soluissa, joissa ei ole seerumia läsnä, MAL-proteiini sijoittuu solulimaan. SRF-faktorin aktivoimiseksi sen pitää kulkeutua tumaan. Aktiini säätelee sekä MAL:n tumakuljetusta että sen aktiivisuutta tumassa. Seerumistimuloimattomissa soluissa on paljon aktiinimo-

nomeerejä, koska aktiinin polymerisaatio on vähäistä. Nämä estävät MAL-proteiinin paikantumisen tumaan inhiboimalla sen kuljetusta sisään tumaan ja edistämällä sen kuljetusta ulos tumasta. Toisaalta aktiinimonomeerit estävät MAL:n aktivoimasta SRF-välitteistä geeniluentaa tumassa. Seerumistimulaation seurauksena aktiini polymerisoituu ja aktiinimonomeerien määrä vähenee. Näin aktiiniin sitoutumaton MAL-proteiini paikantuu tumaan ja aktivoi SRF:n kohdegeenien ilmentymisen. Kuvassa 2 on kuvattu SRF-faktorin aktivoituminen MAL-proteiinin vaikutuksesta. [7, 8.]

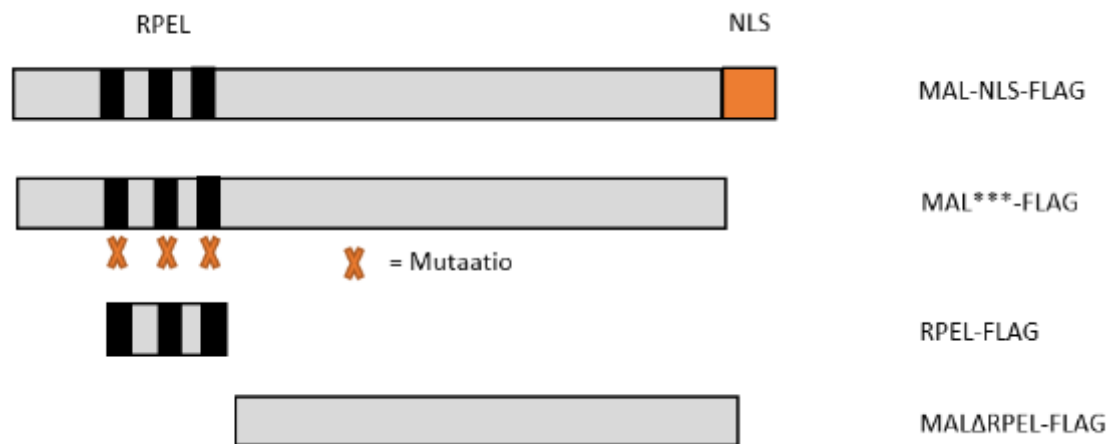


Kuva 2 Seerumistimuloitumattomissa soluissa MAL-proteiini sijaitsee pääasiassa soluli-massa ja tuman aktiini estää kiinnittymisen SRF-faktoriin. Seerumistimulaatiolla MAL akkumuloituu tumaan, aktiini polymerisoituu ja vuorovaikutus näiden välillä vähe-nee. Tästä johtuen MAL voi aktivoida SRF:n toiminnan. [7.]

MAL-proteiinin erilaiset muunnelmät

MAL-proteiinista voidaan tuottaa muokattujen plasmidien avulla erilaisia muunnelmia. Näin voidaan tarkastella mutaatioiden ja proteiinien eri alueiden vuorovaikutusta tuma-levyn proteiinien kanssa. Vartiaisen tutkimusryhmässä käytettyjä proteiinia tuottavia muunnelmia ovat MAL-NLS-FLAG, MAL^{***}-FLAG, RPEL-FLAG sekä MALΔRPEL-FLAG-plasmidit. Kaikissa käytetyissä MAL-plasmideissa on FLAG-sekvenssi, jonka avulla proteiinin ilmentyminen voidaan todeta vasta-aineen avulla tai jota voidaan käyt-tää proteiinin puhdistamiseen soluista immunosaostustekniikalla. MAL-NLS-FLAG sisäl-tää tumalokalisatiossekvenssin (nuclear localization signal, NLS), joka kohdistaa prote-iinin tumaan. MAL sisältää kolme RPEL-motiivia sen N-terminaalisessa päässä (kuva 1). RPEL-domeeni on aktiinia sitova osa, joka säätelee toiminnallaan MAL:n tumakulje-tusta. MAL^{***}-FLAG-plasmidissa on pistemutaatio jokaisessa RPEL-motiivissa. Mutaati-oista johtuen MAL ei pysty sitomaan aktiinia ja paikantuu siis tumaan. RPEL-FLAG si-

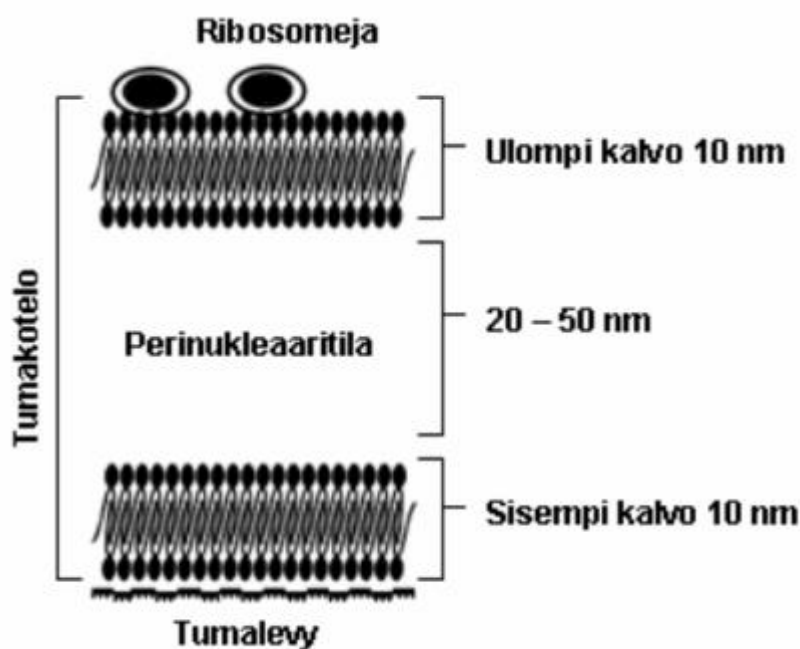
sältää vain aktiinia sitovan RPEL-domeenin [9] ja MAL Δ RPEL-FLAG:sta domeeni puolestaan puuttuu [10]. Kuvassa 3 on havainnollistettu MAL-proteiinin muunnelmien rakenteita.



Kuva 3 MAL-muunnelmien rakenteet

2.2 Tumalevyn proteiinit

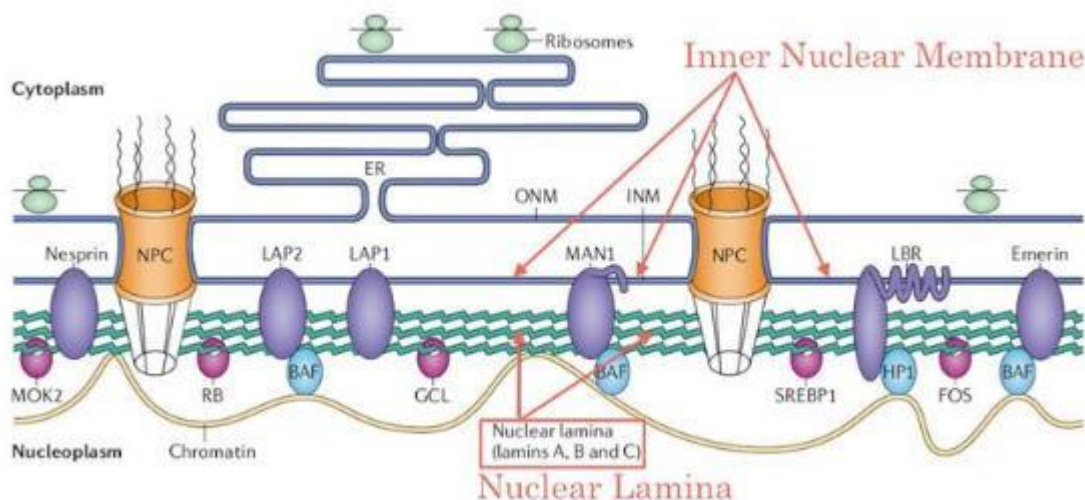
Solussa kaksinkertainen lipidikalvosto erottaa tuman solulimasta (kuva 4). Ulompi kalvo liittyy endoplasmakalvostoon. Sisempään kalvoon eläinsoluilla on kiinnittynyt tumalevy, joka koostuu useista proteiineista. Tumalevyn tehtävänä on suojata tuman ydintä ja säädellä genomien toimintaa esimerkiksi transkriptiotekijöiden avulla. Tumalevyn pääproteiineja ovat välikokoisiin säikeisiin kuuluvat lamiiniproteiinit, jotka muodostavat verkkorakenteen sisemmän tumakalvon lähelle. Tumalevyjen rakenne on erilainen eri soluilla ja esimerkiksi B-tyyppin lamiinit ilmentyvät kaikissa somaattisissa soluissa, mutta A-tyyppin lamiinit vain erilaistuneissa soluissa. Lamiinit ovat osallisena monissa solun tapahtumissa, kuten DNA-synteesissä, transkriptiossa ja ohjelmoidussa solukuolemassa, apoptoosissa. [11.]



Kuva 4 Tumakotelon rakenne [12]

Tuman komponentteja ovat myös sisemmän tumakalvon membraaniproteiinit, kuten hiiren laminaan sitoutuvaa polypeptidi 2- (lamina-associated polypeptide 2, Lap2), Lamiini B -reseptori- (lamin B receptor, LBR) sekä emeriini -proteiinit (kuva 5). Emeriini sekä Lap2 ja sen isoformit sisältävät yhden transmembraanidomeenin, joka ankkuroi nämä proteiinit tumakalvoon siten, että C-terminaalinen pää sijaitsee tumakotelon kalvojen välisessä perinukleaarisessa tilassa. Lap2:n isoformeilla on pituudeltaan vaihteleva N-terminaalinen tumansisäinen domeeni. Emeriini kiinnittyy sekä A- että B-tyyppin lamiineihin.

LBR on transmembraaniproteiini, joka sisältää kahdeksan transmembraanidomeenia ja kiinnittyy vain B-typin lamiiniin. [13, 14.]



Kuva 5 Laminaproteiinien sijoittuminen tumalevyille [15]

2.3 Proteiinien välinen vuorovaikutus

Proteiinit eivät toimi erillään soluissa vaan ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään sekä muiden molekyylien, kuten DNA:n ja RNA:n kanssa. Vuorovaikutusten avulla säädelään muun muassa metabolia- ja signaalireittejä sekä solun ja organismien erilaisia prosesseja. Koska vuorovaikutukset ovat keskeisessä roolissa solun toiminnassa, on niillä vaikutus myös solun terveyteen. Mutaatiot voivat muuttaa proteiinien välisiä vuorovaikutuksia ja aiheuttaa näin organismille erilaisia sairauksia. Proteiinien väliset vuorovaikutukset voivat olla fyysisiä, jolloin ne kiinnittyvät toisiinsa muodostaen erilaisia komplekseja. Vuorovaikutuksesta puhutaan myös silloin, kun proteiinit ovat riippuvaisia toisistaan, vaikuttavat samassa osassa solua ja käyttävät samoja reittejä. [16,17.]

Tumalevyproteiinien ja transkriptiotekijä MAL:n välistä vuorovaikutusta on tutkittu ja etenkin emeriinin ja MAL:n välisessä toiminnassa on havaittu olevan yhteyttä. Tumalevyproteiinit säätelevät aktiinin polymerisaation avulla MAL-SRF-signaalia, mutta suoraa vuorovaikutustakaan ei voida sulkea pois. Näiden proteiinien välinen vuorovaikutusmekanismi on vielä epäselvä. [18.]

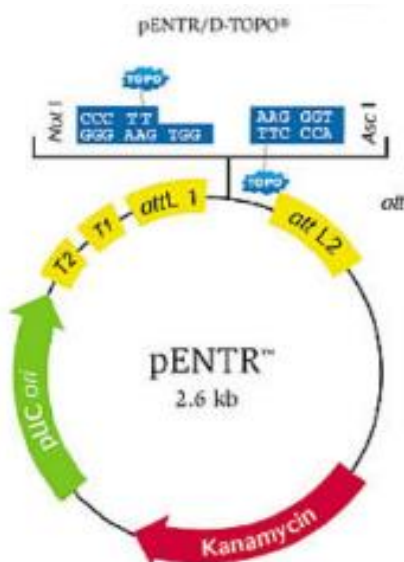
Proteiinien vuorovaikutuksia voidaan tutkia useilla eri tekniikoilla, kuten esimerkiksi immunosaostuksella. Muita käytettäviä analyysitekniikoita on massaspektrometria sekä vuorovaikutusten seulominen sirutekniikalla.

3 Menetelmien taustat

Ennen proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimista immunosaostusmenetelmällä, lamiinaproteiineja koodaavat geenit kloonataan sopiviin vektoreihin. Kloonausmenetelminä voidaan käyttää TOPO-kloonausta ja sen jälkeen tehdä Gateway-kloonaus.

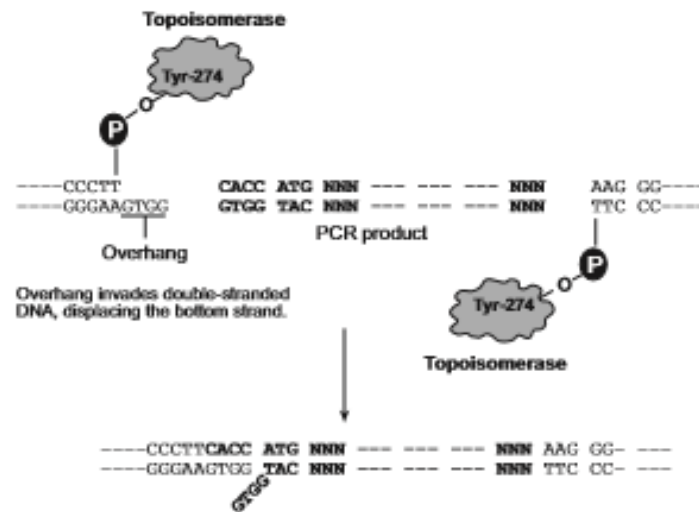
3.1 TOPO-kloonaus pENTR/D-TOPO-kloonausmenetelmällä

TOPO-kloonaukseen voidaan käyttää valmista Invitrogen pENTR/D-TOPO-kloonauskitiä (K2400-20), joka sisältää reaktioon tarvittavat reagenssit. Kloonaus perustuu spesifillä alukkeilla monistetun PCR-tuotteen liittämiseen TOPO-vektoriin. Kuvassa 6 on kloonauksessa käytetty TOPO-vektori.



Kuva 6 TOPO-vektori [19]

Kuvassa 7 on havainnollistettu TOPO-kloonauksen periaatetta.



Kuva 7 TOPO-kloonauksen periaate [19]

Alukkeet on suunniteltu niin, että tuotteeseen syntyy 5'-pään neljän nukleotidin komplementaarinen osa TOPO-vektorin kanssa (kuva 7). Vaccinia-viruksesta eristetty Topoisomeraasi on kiinnitetty linearisoidun TOPO-vektorin DNA:han 3'-fosfaattiin C/TCCTT-kohtaan kovalenttisesti. Tämä mahdollistaa insertin kiinnittymisen vektoriin ilman ligaasientsyymiä. TOPO-kloonauksen avulla saadaan tehtyä pENTR-vektori, josta insertti voidaan siirtää haluttuun destinaatiovektoriin Gateway-kloonauksen avulla. [19.]

3.2 Gateway-kloonaukseen Gateway LR clonase II Enzyme mix -kitin avulla

Gateway-kloonaukseen voidaan käyttää myös valmista Invitrogenin kittiä Gateway LR clonase II Enzyme mix (11791-100). Gateway-kloonaukseen perustuu bakteriofagi lambdan sekvenssispesifiseen rekombinaatiokykyyn. Lambdan ja *Escherichia coli*:n koodaamien rekombinaatioproteiinien (Clonase enzyme mix) avulla tapahtuu perintöaineksen vaihtumista lambdan ja *E.coli*:n kromosomien välillä.

Lambdan rekombinaatio on katalysoitu entsyymien avulla. Entsyymit kiinnittyvät spesifisesti kromosomien att-kohtaan, katkaisevat sekä kiinnittävät pENTR:in ja destinaatiovektorin DNA:t kovalenttisesti yhteen. Rekombinaatioreaktiossa tapahtuu kaksi juosteen vaihtumista ja ligaatiota. Toinen tuote on haluttu destinaatiovektori, joka sisältää pENTR-vektorin insertin ja toinen on sivutuote. [20.] Kuvassa 8 on kloonauksen periaate.



Kuva 8

Gateway-kloonauksessa Entry sisältää attL1- ja attL2-kohdat ja vektori attR1- ja attR2-kohdat. Entsyymien katalysoiman rekombinaation avulla perintöaines näiden välillä vaihtuu ja saadaan haluttu klooni. Muodostuu attB-kohdan sisältävä klooni sekä sivutuote. [19.]

3.3 Immunosäöstus

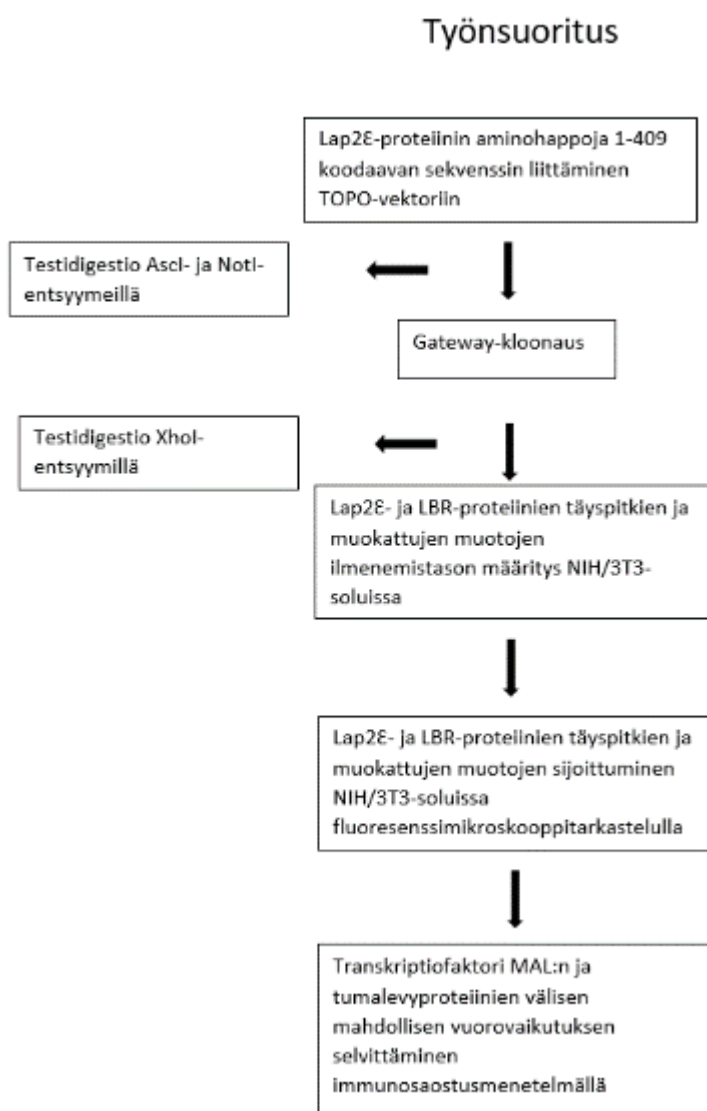
Immunosäostuksella voidaan tutkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Menetelmä perustuu antigeenin ja vasta-aineen keskinäiseen spesifiseen sitoutumiseen. Spesifisellä vasta-aineella voidaan rikastaa biologisesta näytteestä vasta-aineen tunnistamaa antigeenia. Sopivissa oloissa myös antigeenin sitomat proteiinit rikastuvat prosessissa.

Käytetty vasta-aine voi tunnistaa endogeenisen proteiinin. Immunosäostuksessa käytetään usein myös vasta-aineita lyhyitä epitooppisekvenssejä, kuten FLAG- ja HA-sekvenssejä vastaan. Nämä vasta-aineet tunnistavat ja rikastavat soluissa eksogeenisesti ilmennettäviä FLAG- ja HA-sekvesseihin liitettyjä proteiineja. HA on hemagglutiniini, joka on löydetty influenssaviruksen pinnoilta. Se on antigeeninen glykoproteiini, jonka pintarakenteen avulla proteiini voidaan havaita. [21.]

Menetelmässä tuotetaan soluissa haluttuja proteiineja ja vapautetaan ne hajottamalla solut. Vasta-aineella päällystettyjen agarosihelmien avulla saadaan proteiinit ja niiden kompleksit erotettua liuoksesta. Säostuksen jälkeen proteiinit erotellaan koon perusteella SDS-PAGE-ajolla (Sodium dodecyl sulphate Polyacrylamide gel electrophoresis) sekä siirretään Western blottauksella nitroselluloosakalvolle. Ennen proteiinien erottelua näytteisiin lisätään Laemmliin SDS-näytepuskuria, jonka avulla ne varataan negatiiviksi. Proteiinit myös denaturoidaan 95 °C:ssa 5 minuutin ajan, jotta niistä saadaan lineaarisia peptidiketjuja. Western blottauksessa proteiinit siirretään elektroforeesin avulla nitroselluloosakalvolle, josta ne voidaan havaita vasta-aineiden avulla.

4 Työn suoritus

Projekti aloitettiin valmistamalla tutkimusryhmän käytöstä puuttuvat, tutkittavia proteiineja tuottavat, plasmidit. Lap2E- sekä LBR-proteiineista haluttiin monistaa vain tumalevyyn kiinnittymätöntä sekvenssiä. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että tumakalvon läpäisemä osa sitoutuu mahdollisesti epäspesifisesti immunosaostuksessa käytettyihin agaroosihelmiin. Proteiineja tuottavien plasmidien oikeellisuus tarkastettiin testidigestion sekä sekvenssitarkastelun avulla. Kun käytössä oli tarvittavat konstruktiot, proteiineja tuotettiin NIH/3T3-soluissa ja haluttujen proteiinien välistä vuorovaikutusta tutkittiin immunosaostuksen avulla. Kuvassa 9 on kuvattu projektinkulku.



Kuva 9

Projektinkulku

4.1 Lap2E(1-409)-proteiinia tuottavan plasmidin valmistus

Lap2E(1-409):n monistaminen PCR-menetelmällä

Templaattina Lap2E:n aminohappoja 1-409 koodaavan sekvenssin monistamiseen käytettiin hiiren kokopitkää Lap2E-geeniä 2HA-C1-vektorissa. Monistetusta insertistä tehtiin TOPO-reaktion avulla ensin pENTR-vektori, joka liitettiin Gateway-kloonauksella haluttuun pDest-vektoriin. Inserttia monistettiin spesifisillä alukkeilla V1650 ja V1651 (taulukko 1) Thermoscientificin Phusion Hot Start II DNA -polymeraasin avulla (F-549S).

Taulukko 1 PCR-reaktion alukkeet

Lyhenne	Sekvenssi
V1650	CACCATGCCGGAGTTCCTAGAG
V1651	GGA GCG TCT CTT CTT TGT CTT

PCR-reaktiossa käytetyt reagenssit sekä loppukonsentraatiot on kuvattu taulukossa 2. Tilavuus tasattiin nukleasivapaalla vedellä haluttuun tilavuuteen.

Taulukko 2 PCR-reaktioseos

Reagenssi	Loppu konsentraatio
Phusion HS II	2 U
Aluke 1 (V1650)	0,5 mM
Aluke 2 (V1651)	0,5 mM
Templaatti (Lap2e-2HA-C1)	406 ng
dNTP mix	200 µM
Buffer 5X HF	1x
Nukleasivapaa vesi	50µl-x

Insertin Lap2E(1-409) monistaminen tehtiin taulukon 3 mukaisella PCR-ohjelmalla.

Taulukko 3 PCR-ohjelma

Aste	Aika	} x29
95	3 min	
98	30 s	
63	30 s	
72	1 min	
72	3 min	
4	∞	

Insertin teoreettinen koko on 1227 bp. PCR-tuote ajettiin 0,8 % agarosigeelillä, jotta saatiin näkyviin monistuneet DNA:t. Oikean kokoinen vyöhyke eristettiin ja puhdistettiin ThermoScientificin Gel extraction -kitin (K0692) ohjeiden mukaan.

Lap2E(1-409):n kloonaukseen TOPO-vektoriin

Monistettu, eristetty ja puhdistettu insertti Lap2E(1-409) liitettiin TOPO-vektoriin. Puhdistetun DNA:n konsentraatio mitattiin Nanodrop-laitteella, jotta saatiin laskettua reaktioon tarvittava DNA:n määrä. TOPO-reaktioon tarvittava DNA:n määrä laskettiin kaavalla $0,007 \text{ ng} \times \text{tuotteen koko emäspareina}$. TOPO-kloonaukseen tehtiin Invitrogenin pENTR/D-TOPO cloning -kitin (K2400-20) ohjeiden mukaan.

Reaktioon tarvittava DNA-määrä lisättiin putkeen ja tilavuus tasattiin steriilillä vedellä 4 μl :aan. Seokseen lisättiin 1 μl kitin suolaliuosta (salt solution) ja sekoitettiin hyvin pipetoimalla. Tätä liuosta otettiin 2,5 μl uuteen putkeen, minne lisättiin 0,5 μl TOPO-vektoria (pENTR/D-TOPO Vector). Reaktioseosta inkuboitiin 15 minuutin ajan huoneenlämmössä. Transformaatiolla TOPO-reaktioseos (3 μl) siirrettiin kompetentteihin *E.coli* bakteereihin (200 μl TOP10-soluja). Seosta inkuboitiin jäällä 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen bakteereille tehtiin lämpöshokki 42 °C:ssa vesihautteessa 30 sekunnin ajan ja inkuboitiin jäällä vielä 2 minuuttia, jonka jälkeen lisättiin 250 μl S.O.C-kasvatusliuosta (Liite1). Seosta inkuboitiin ravistelijassa tunnin ajan +37 °C:ssa. Pelletti sentrifugoitiin pohjaan (2000 rpm 2 minuuttia). Supernatantista kaadettiin suurin osa pois (noin 700 μl) ja pelletti liuotettiin varovaisesti jäljelle jääneeseen liuokseen. Transformoituja bakteereja kasvatettiin +37 °C:ssa 16 tunnin ajan Luria Broth -kanamysiinimaljalla (Liite 1). Maljalle kasvaneista pesäkkeistä tehtiin miniprep-kasvatukset. Yhtä pesäkettä kasvatettiin 3 ml:ssä Luria Broth -lientä (Liite 1), jossa oli 25 $\mu\text{g/ml}$ kanamysiini-antibioottia. Kasvatuksia inkuboitiin vuorokauden ajan ravistelijassa (180 rpm) +37 °C:ssa. Plasmidit eristettiin DNA Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep (K0503) -kitin ohjeiden mukaan. Miniprepeistä tehtiin testidigestio *AscI*- ja *NotI*-entsyymien avulla ja näytteet ajettiin 0,8% agarosigeelillä onnistuneiden kloonien selvittämiseksi. Positiivisena kontrollina onnistuneesta transformatiosta käytettiin TOPO-vektoriin kloonattua ihmisen β -aktiinia. Lopuksi plasmidit lähetettiin sekvensoitavaksi MacroGenille universaaleilla alukkeilla M13F ja M13R-Puc.

Gateway-kloonaus HA- ja FLAG-leiman sisältäviin destinaatiovektoreihin

Gateway-kloonauksessa insertti liitettiin haluttuun pDEST-vektoriin. Kloonaus tehtiin In-vitrogen:in Gateway LR clonase II Enzyme mix (11791-100) -kitin ohjeiden mukaan. Insertti liitettiin sekä 2HA-pDEST-C1 että 2FLAG-pDEST-C1 vektoreihin. Kloonaukseen käytettiin 150 ng pENTR:iä sekä pDEST-vektoria ja 2 µl LR klonaasi -entsyymiä (LR clonase). Tilavuus tasattiin 10 µl:aan 1xTE-puskurilla (Liite 1). Reaktioseosta inkuboitii tunti huoneenlämmössä, minkä jälkeen lisättiin 2 µg proteaasi K:ta (protease K). Tämä entsyymi on substraattispesifinen ja lopettaa entsyymireaktion hajottamalla proteiineja. Inkubointia jatkettiin entsyymien lisäyksen jälkeen 10 minuuttia +37 °C:ssa.

Plasmidit transformoitiin kompetentteihin *E.coli*-soluihin, kuten TOPO-kloonauksessa mutta kasvatettiin Luria Broth -ampisilliinimaljoilla (Liite 1). Kasvaneista pesäkkeistä eristettiin ja puhdistettiin DNA kuten aikaisemmin (DNA Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0503)). Miniprepeille tehtiin testidigestio *XhoI*-entsyymillä. Testidigesti-onäytteet ajettiin 0,8 % agarosigeelillä, jotta saatiin selville onnistuneet kloonaukset. Onnistuneista kloonauksista tehtiin maxiprepi, jotta saatiin suurempi määrä eristettyjä plasmideja. Maxiprepeissä alkukasvatus tehtiin siirrostamalla pesäke 300 ml:aan LB-liuosta, joka sisälsi 100 µg/ml ampisilliinia. Plasmidit eristettiin ja puhdistettiin Nucleo Bond® xtra Maxi (70414) -kitin ohjeiden mukaan.

4.2 Proteiinien tuotto NIH/3T3-soluissa

Tutkittavia proteiineja tuotettiin NIH/3T3-soluissa. Solulinja on todettu toimivaksi transfektioissa. Soluille käytettiin kasvatusliuoksena DMEM:ia (Dulbecco's Modified Eagle Medium 12-614F), mihin lisättiin 10 % naudan sikiön seerumia (Fetal Bovine Serum 10270-106), 1 % penisiliini-streptomysiini-antibioottiliuosta (15140-122) sekä 1 % glutamaxia (35050-038) edistämään haluttujen solujen kasvua. Soluja kasvatettiin inkubaattorissa (NuAire, 5,0 CO₂ %) +37 °C:ssa immunosaostusta varten 100 mm maljoilla, kunnes solujen määrä saavutti 60-80 % kasvutiheyden viljelyalustan pohjasta. Transfektio NIH-soluihin tehtiin Polyplus transfection jetPRIME -kitillä. Transfektiota varten tehtiin seos, johon lisättiin jokaista tutkittavaa plasmidia 3 µg, 500 µl jetPRIME-puskuria sekä 15 µl jetPRIME-reagenssia. Seosta inkuboitii 10 minuuttia huoneenlämmössä ja lisättiin tiipoittain soluille. Solujen inkubointia jatkettiin transfektion jälkeen samoissa olosuhteissa vuorokauden ajan.

4.3 Laminaproteiinien ilmentymistason määrittäminen

Täyspitkien sekä muokattujen tumalevyn proteiinien ilmentymistasoa NIH/3T3-soluissa tutkittiin transfektoimalla 6-kuoppalevyllä olevat solut jetPRIMEllä solujen peittoasteen ollessa 60-80 % viljelyalustan pohjasta. Transfektoitavan DNA:n määrä oli 1000 ng, josta tutkittavaa DNA:ta oli 350 ng ja loput pEF-Myc-plasmidia tehostamassa reaktiota. Soluja inkuboitiin 48 tunnin ajan +37 °C:ssa, jonka jälkeen ne pestiin 1xPBS-puskurilla (Phosphate-buffered saline) (Liite 1) ja hajotettiin 250 µl 1xLaemmli-näytepuskurilla (4xSDS-latauspuskuri: 40 % glyserolia, 4 % SDS, bromifenoli sininen, 250 mM Tris-HCl, DTT (Ditiotreitol)). Solulysaatit kerättiin kaapimalla.

Näytteiden proteiinit erotettiin koon perusteella SDS-PAGE-ajolla sekä siirrettiin Western blottauksella nitroselluloosakalvolle. Kalvolta proteiinit havaittiin vasta-aineiden avulla. Ennen SDS-PAGE-ajoa proteiinit imettiin injektioneulan (0,55x25 mm) läpi DNA:n hajottamiseksi sekä denaturoitiin +95 °C:ssa 5 minuutin ajan. Näytteet ladattiin valmiille 4-20 %:lle Bio-Radin gradienttigelille ja ajettiin 120 V 1,5 tuntia. Ajopuskurina käytettiin 1xRunning puskuria (Liite 1). Ajon jälkeen tehtiin Western blottaus Bio-Rad:in Trans-Blot® Turbo™ Transfer -laitteistolla. Nitroselluloosakalvot värjättiin blottauksen jälkeen Ponceau-värillä ja huuhdottiin MilliQ-vedellä. Kalvoja pidettiin 5 % maidossa PBS-Tween-puskuriin (0,1 % Tween-20-liuosta 1xPBS-puskurissa) laimennettuna tunnin ajan huoneenlämmössä tasoheilurissa. Kalvot huuhdeltiin PBS-Tween-puskurilla, jonka jälkeen niitä pidettiin maitoon laimennetussa vasta-aineessa tasoheilurissa tunnin ajan. Vasta-aineena käytettiin Anti-HA-HRP (Clone HA-7, Sigma H6533) 1:8000 laimennosta. Kalvot pestiin vielä kolme kertaa 10 minuutin ajan PBS-Tween-puskurilla ja kuvattiin FUJIFILM LAS-3000 -laitteella. Detektointiliuoksena käytettiin kaupallista valmisliuosta (Pro Signal™ ECL Detection Reagents).

4.4 Solujen värjäys

Solujen värjämisellä haluttiin tutkia täyspitkien ja muokattujen proteiinien sijoittumista solussa. Soluja kasvatettiin peitinlaseilla 24-kuoppalevyllä, kunnes solujen peittoaste eli konfluenssi oli 60-80 % viljelyalustan pohjasta. Transfektiot tehtiin jetPRIME-reagenssilla käyttämällä 50 ng tutkittavaa plasmidia sekä 150 ng pEF-myc-plasmidia tehostamaan reaktiota. Transfektion jälkeen soluja kasvatettiin vielä vuorokauden ajan, jonka jälkeen tehtiin solujen kiinnitys. Solut pestiin kerran 1xPBS-puskurilla varovasti niin, että ne eivät

irronneet. Solujen kiinnitys tehtiin 4 % PFA-puskurilla (paraformaldehydi) (Liite 1) PBS:ssä (250 µl/kuoppa). Levy peitettiin foliolla ja solujen annettiin kiinnittyä 20 minuuttia. Kiinnittymisen jälkeen solut pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella. Solut tehtiin läpäiseviksi inkuboimalla niitä 0,1 % Triton X-100 -detergentillä PBS-puskurissa (250 µl/kuoppa) viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen solut pestiin kerran PBS-liuoksella. Kuoppiin lisättiin 200 µl blokkaukspuskuria (1xPBS, 10 % FBS, 1 % BSA (Bovine Serum Albumin), 1 % gelatiini), jolla vähennettiin solujen epäspesifistä värjäytymistä. Puskurin annettiin vaikuttaa 30 minuutin ajan. Blokkauksen jälkeen peitinlasit siirrettiin 6-kuoppa-levylle pinsettien avulla. Solujen värjäys tehtiin kahdella eri vasta-aineella. Primaarisena vasta-aineena käytettiin anti-HA-vasta-ainetta, josta tehtiin 1:250 laimennos blokkaukspuskuriin. Laimennosta laitettiin 45 µl peitinlasin päälle, levy suojattiin foliolla ja vasta-aineen annettiin reagoida tunnin ajan. Solut pestiin kolme kertaa PBS/Dulbecco-liuoksella (Liite 1). Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin 1:450 laimennosta Thermoscientificin AlexaFluor®488:sta (A-11001), joka tunnistaa ensimmäisen vasta-aineen. Se sisältää Alexa 488 -fluoroforin, jonka avulla tutkittavat proteiinit voidaan paikallistaa soluista mikroskoopilla. Vasta-ainelaimennosta laitettiin 45 µl ja annettiin reagoida tunnin ajan levy folioon käärittynä. Peitinlasit pestiin vielä kolme kertaa PBS-liuoksella sekä huuhdeltiin pinsettien avulla Milli-Q-vedellä. Milli-Q-vesi on ultrapuhdasta käänteisosmoosilla ja ioninvaihtomenetelmällä käsiteltyä vettä. Mikroskooppilevyille laitettiin 8 µl Mowiolia (Mowiol®4-88, Sigma), joka kiinnittää solut levyille. Näytteet tarkastettiin Fluid Cell Imaging Station -mikroskoopilla (Life Technologies).

4.5 Lap2E:n ja emeriinin transfektio NIH/3T3-soluihin MAL:n kanssa

Lap2- ja MAL-proteiinien transfektiot NIH-soluihin

Lap2E- ja MAL-proteiinien välisiä vuorovaikutuksia tutkittiin erilaisten näyteyhdistelmien avulla. Taulukon 4 mukaiset näyteyhdistelmät transfektoitiin 60-80 % viljelyalustan peittoasteen saavuttaneisiin NIH-soluihin. Kontrollinäytteinä käytettiin jokaisella näytteellä transfektoituja soluja tyhjän 2Flag-N3-plasmidin kanssa, jolloin saatiin tausta immunosäätösreaktiolle eli määritettiin sitoutuvatko proteiinit epäspesifisesti helmiin. Varsinaiset näytteet transfektoitiin NLS-MAL-FLAG-plasmidin kanssa. Reaktion kontrollina käytettiin ihmisen Lap2β-proteiinia (Lap2β-2HA-C1), josta oli jo aikaisempaa informaatiota. Hiiren Lap2E-proteiinista käytettiin sekä muokattua Lap2E(1-409)-2HA-C1 että täysipitkää muotoa LapE-2HA-C1.

Transfektiot tehtiin NIH-soluihin jetPRIME-reagenssilla siten, että näytteeseen tuli 3 µg kumpaakin tutkittavaa plasmidia, 500 µl jetPRIME-puskuria sekä 15 µl jetPRIME-reagenssia.

Taulukko 4 Lap2:en ja MAL:in transfektiot soluille

Näyte	Plasmidi 1	Plasmidi 2
1	Lap2β-2HA-C1 (H.s)	2FLAG -N3
2	Lap2ε-2HA-C1 (M.m)	2FLAG-N3
3	Lap2ε(1-409)-2HA-C1 (M.m)	2FLAG-N3
4	Lap2β-2HA-C1 (H.s)	NLS-MAL-FLAG
5	Lap2ε-2HA-C1 (M.m)	NLS-MAL-FLAG
6	Lap2ε(1-409)-2HA-C1 (M.m)	NLS-MAL-FLAG

Emeriinin ja MAL-proteiinien transfektiot NIH-soluihin

Immunosaostuksella tutkittiin myös emeriinin vuorovaikutusta MAL:n kanssa. Vuorovaikutusta tutkittiin rikastamalla immunosaostuksessa vuorollaan sekä MAL:ia että emeriinia. MAL-proteiinissa oli FLAG-sekvenssi, joten sen rikastamiseen käytettiin FLAG-agarosihelmiä. MAL:iin mahdollisesti kiinnittyneen emeriinin havaitsemiseen käytettiin sen epitooppisekvenssin tunnistavaa anti-HA-vasta-ainetta. Proteiinien välistä vuorovaikutusta tutkittiin myös rikastamalla solulysaatista HA-agarosihelmien avulla emeriini. Anti-FLAG-vasta-aineen avulla tutkittiin MAL:n kiinnittymistä proteiiniin. Vuorovaikutussuhteita analysoidessa MAL-proteiinista käytettiin neljää erilaista muotoa (MAL-NLS-FLAG, MAL***-FLAG, RPEL-FLAG ja MALΔRPEL-FLAG).

Solut transfektoitiin taulukon 5 mukaisilla näytteillä, kun tutkittiin proteiinien vuorovaikutusta rikastamalla ensin MAL-proteiini solulysaateista. Negatiivisena kontrollina käytettiin soluja, joihin transfektoitiin tyhjä FLAG-plasmidi emeriinin kanssa. Kontrollin avulla tutkittiin emeriinin epäspesifistä sitoutumista FLAG-agaroosihelmiin. Jokaista tutkittavaa plasmidia transfektoitiin 3 µg soluihin jetPRIME-reagenssilla.

Taulukko 5 MAL:n ja emeriinin transfektiot soluille, kun käytettiin immunosaostuksessa FLAG-agaroosihelmiä

Näyte	Plasmidi 1	Plasmidi 2
1	FLAG-empty	Emd-HA
2	NLS-MAL-FLAG	Emd-HA
3	MAL***-FLAG	Emd-HA
4	RPEL-FLAG	Emd-HA
5	MALΔRPEL-FLAG	Emd-HA

Kun rikastettiin emeriini solulysaatista ja tutkittiin MAL:n kiinnittymistä siihen, transfektoitiin solut taulukon 6 mukaisilla plasmideilla. MAL:n eri muodoista valmistettiin kolme negatiivista kontrollinäytettä tyhjän HA-vektorin kanssa, joiden avulla voitiin tutkia proteiinien mahdollista vuorovaikutusta immunosaostuksessa käytetyn anti-HA-affiniteettigeelin kanssa. Varsinaisesti proteiinien vuorovaikutusta tutkittiin Emd-HA-C1:lla ja erilaisten MAL-muotojen avulla.

Taulukko 6 MAL:in ja emeriinin transfektiot soluille, kun käytettiin immunopresipitaatiossa HA-agaroosihelmiä

Näyte	Plasmidi 1	Plasmidi 2
1	MAL-NLS-FLAG	HA-C1
2	MAL***-FLAG	HA-C1
3	RPEL-FLAG	HA-C1
4	MAL-NLS-FLAG	Emd-HA
5	MAL***-FLAG	Emd-HA
6	RPEL-FLAG	Emd-HA

4.6 Immunosaostus

Tutkittavilla plasmideilla transfektoituja soluja inkuboitiin 48 tuntia +37 °C:ssa, jonka jälkeen solut olivat valmiita immunosaostukselle. Kaikkia käytettyjä reagensseja ja näytteitä pidettiin jäällä työskentelyn ajan. Ensin solut pestiin kylmällä PBS-liuoksella. Lyysauspuskurina käytettiin IP-puskuria (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl), joka

sisälsi 0,5 % Triton X-100 -detergenttiä, hajottamaan solukalvot sekä proteaasi-inhibiitoreita (Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, Sigma Aldrich (4693132001)). Solut hajotettiin 500 µl:aan puskuria ja lyaatti irrotettiin maljalta solukaapimella. Solulysaatit sentrifugoitiin (13 000 rpm) 10 minuutin ajan +4 °C:ssa (Eppendorf Centrifuge 5415R). Tämän seurauksena pelletti sisälsi mahdollisesti hajoamattomat solut sekä muun liukenemattoman materiaalin ja pääosa proteiineista oli tällöin supernatanttiin vapautuneina.

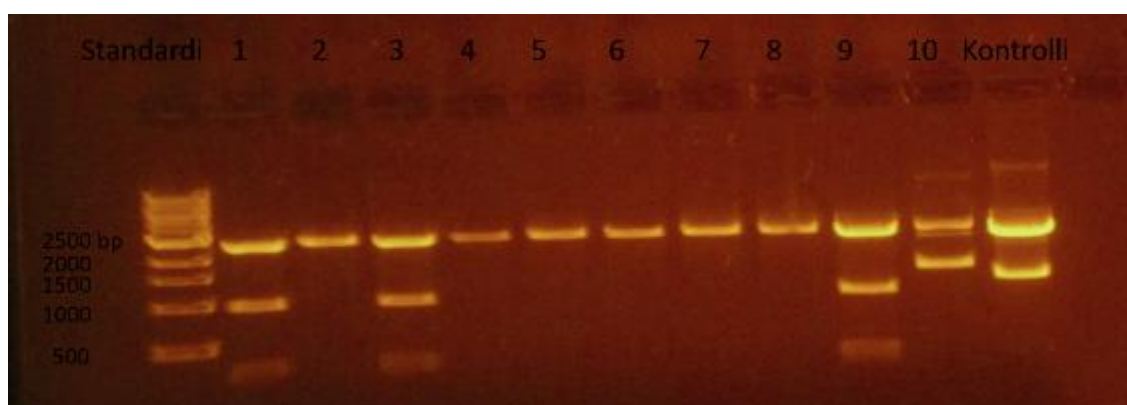
Solulysaatista valmistettiin ns. input-näytteet lisäämällä 10 µl 4xLaemmli-näytepuskuria 30 µl:aan supernatanttia. Input-näytteet sisältävät siis kaikki solussa tuotetut proteiinit. Loppusupernatantti käytettiin immunosaostukseen. Näytteestä riippuen käytettiin joko anti-FLAG-agaroosihelmiä tai Red anti-HA -affiniteettigeeliä. Anti-FLAG-helmet ovat 4 % agaroosihelmiä, joihin on liitetty monoklonaalinen hiiren Anti-FLAG M2 -vasta-aine. Anti-HA-affiniteettigeeli sisältää myös agaroosihukkasia, joihin on kiinnitetty kovalenttisesti monoklonaalinen HA-sekvenssin tunnistava vasta-aine.

Agaroosihelmiä tai geeliä (25 µl) pestiin ensin IP-puskurilla ilman Triton X-100 -reagenssia sentrifugoimalla (2500-3000 rpm) 5 minuuttia +4 °C:ssa (Eppendorf Centrifuge 5415R). Pesuliuos poistettiin varovasti koskematta pohjalla oleviin helmiin. Loput supernatantista siirrettiin helmiä sisältäviin putkiin ja annettiin pyöriä rotaatiolaitteessa +16 °C:ssa kylmähuoneessa vähintään kaksi tuntia. Helmet sentrifugoitiin pohjaan (3000 rpm) 5 minuuttia +4 °C:ssa (Eppendorf Centrifuge 5415R). Helmet pestiin kolme kertaa IP-puskurilla (750 µl), missä oli 0,1 % Triton X-100 -detergenttiä, sekä kerran IP-puskurilla ilman tritonia. Sitoutuneet proteiinit irrotettiin helmistä ja vasta-aineesta lisäämällä 80 µl 1xLaemmli-näytepuskuria näytteeseen. Näytteiden proteiinit denaturoitiin keittämällä 5 minuuttia +95 °C blokissa. Helmet sentrifugoitiin putken pohjalle ja näytteet laddattiin valmiille 4-20 %:lle Bio-Radin gradientti SDS-PAGE-geelille (1,5 tuntia 120 V). Ajon jälkeen tehtiin Western blottaus. Signaalien paikantamiseen käytettiin tutkittavan proteiinin leimaa vastaavaa vasta-ainetta. Nitroselluloosakalvot kuvattiin FUJIFILM LAS-3000 -laitteella säädellen valotusaikaa niin, että saatiin näkyviä signaaleja.

5 Tulokset

5.1 Lap2 ϵ (1-409):n TOPO-Kloonaus

Lap2 ϵ (1-409):n onnistuneet kloonaukset TOPO-vektoriin osoitettiin testidigestiolla *AscI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä. TOPO-vektori on noin 2,6 kb kokoinen ja insertin teoreettinen koko on noin 1200 bp. Insertissä on toiselle restriktioentsyymille sisäinen tunnistuskohta, jonka vuoksi se digestoituu kahteen osaan. Kuvasta 10 nähdään, että näytteissä 1, 3 ja 9 entsyymit ovat leikanneet mahdollisesti oikean kokoiset palat plasmidista. Insertti digestoituu noin 1000 bp ja 200 bp kokoisiksi palasiksi. Signaali 2500 bp:n kohdalla kuvaa TOPO-vektoria. Sekvenssitarkastelun perusteella varmistettiin vielä tulosten oikeellisuus. Näytteille, joille saatiin vain yksi signaali 2500 bp:n kohdalle, inserttiä ei ole saatu liitettyä TOPO-vektoriin. Kontrollina transformaation onnistumisen havainnoimiseen käytettiin ihmisen β -aktiinia, jonka avulla voidaan todeta reaktio toimivaksi.

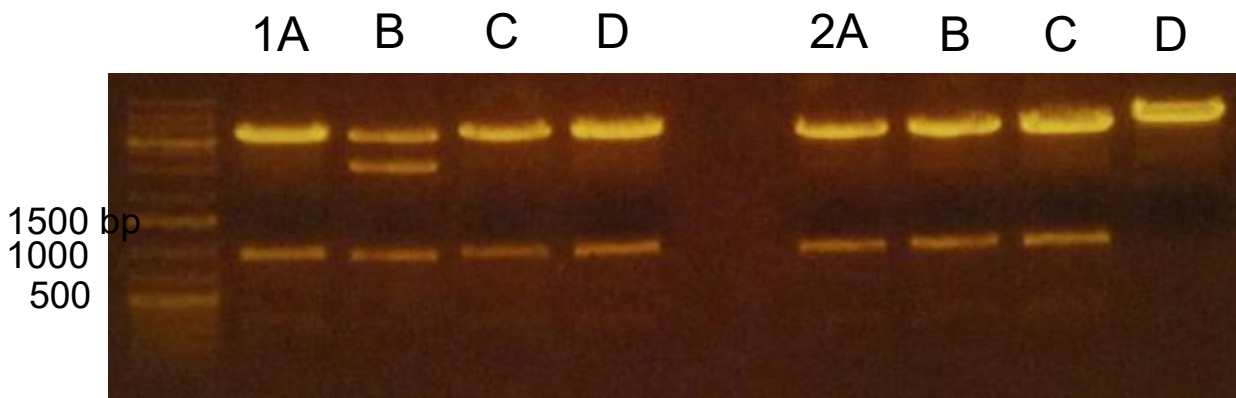


Kuva 10 Topo-kloonauksen testidigestio *AscI*- ja *NotI*-entsyymeillä

Näytteet 3 ja 9 olivat sekvenssitarkastelun perusteella onnistuneet. Näytteellä 3 jatkettiin Gateway-kloonaukseen.

5.2 Gateway-kloonauk

Gateway-kloonauksessa saatu pENTR-vektori liitettiin HA- ja FLAG-sekvenssin sisältäviin destinaatiovektoreihin. Testidigestiossa *XhoI*-restriktioentsyymi leikkaa plasmidista siihen liitetyn 925 bp kokoisen insertin, jonka avulla saatiin varmistettua onnistuneet kloonaukset. Kuvassa 11 on esitetty agaroosigeelijaio testidigestionäytteistä.

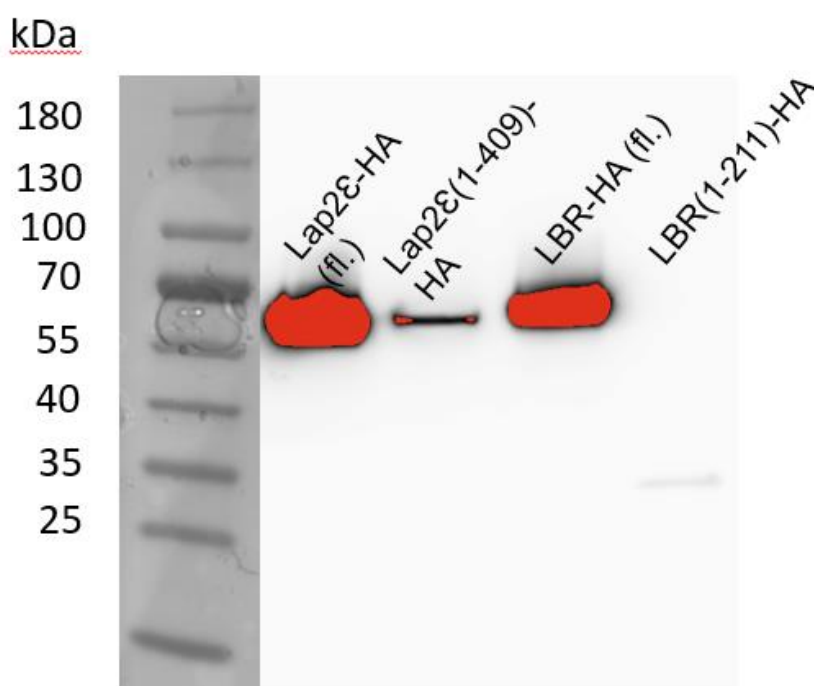


Kuva 11 Gateway-kloonauksen testidigestio *xhoI*-entsyymillä

Kuvasta 11 nähdään, että näytteet 1B ja 2D poikkeavat signaaleiden koolta muista. 1B-näytteessä plasmidit ovat digestoituneet kolmeen osaan, kun taas näytteessä 2D digestoitumista ei ole tapahtunut. Muissa näytteissä entsyymi on leikannut kuvan perusteella oikean kokoisen insertin. Onnistuneita kloonauksia käytettiin proteiinin tuottoon ja vuorovaikutusten tutkimiseen immunosäostyksessä.

5.3 Proteiinien ilmenemistason määrittäminen

Ilmenemistason määrittämisellä selvitettiin NIH/3T3-solujen kykyä tuottaa tutkittavien proteiinien täyspitkiä sekä muokattuja muotoja. Kuvassa 12 nähdään tulokset Western blottauksen jälkeen, kun vasta-aineena käytettiin HA-epitoopin tunnistavaa Sigman anti-HA-HRP-vasta-ainetta (clone HA-7 H6533).



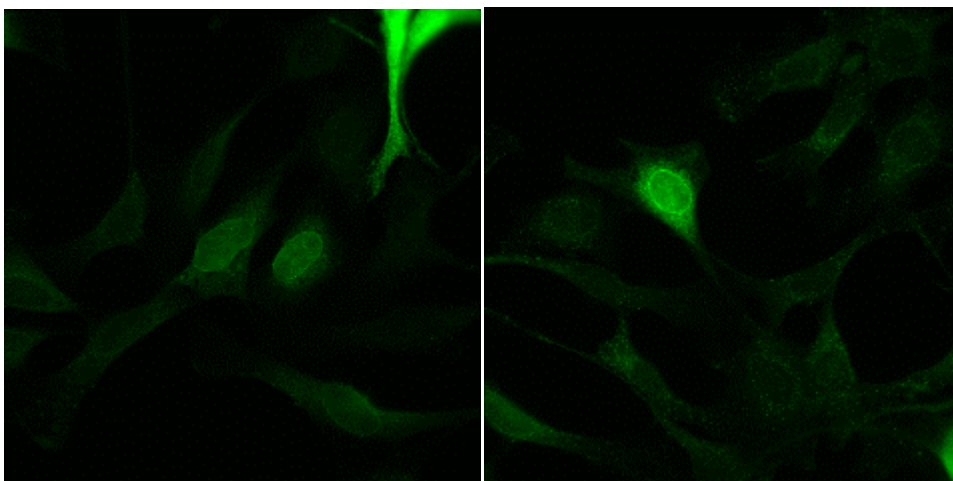
Kuva 12 Proteiinien ilmenemistason määrittäminen NIH-soluissa

Kuvasta 12 nähdään, että täyspitkät proteiinit ilmentyvät soluissa suhteellisen hyvin (noin 60 kDa kokoisia). Muokatut proteiinit eivät ilmene soluissa kuitenkaan samalla tasolla luonnollisten proteiinien kanssa. Näytteelle Lap2E(1-409) saatiin näkyviin heikko signaali noin 60 kDa kohdalle, kun valotusaika oli tarpeeksi pitkä. LBR(1-211):lle saatiin hyvin heikko noin 35 kDa kokoinen signaali. Jos solu kykenee tuottamaan Lap2E(1-409)-proteiinia, niin mahdollisesti se kykenee tuottamaan samankaltaisella mekanismilla myös LBR(1-211)-proteiinia. Signaalit eivät ole kuitenkaan keskenään täysin vertailukelpoisia, koska geelille ladattujen näytteiden määrissä on saattanut olla eroavaisuuksia. Proteiinien ilmentymistasomäärittäksen jälkeen tehtiin solujen värjäys, jotta voitiin tarkastella minne tuotetut proteiinit sijoittuvat solussa.

5.4 Solujen värjäyksen fluoresenssimikroskooppikuvat

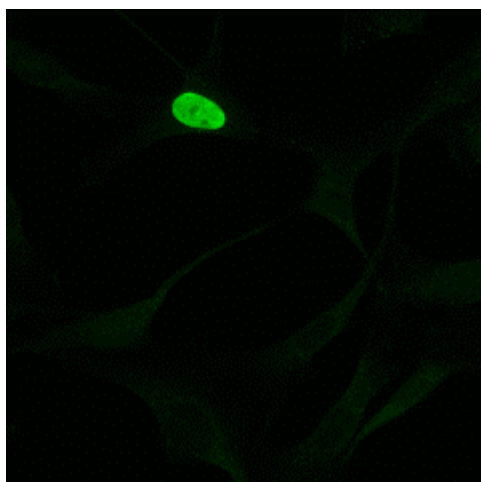
Transfektoitujen solujen värjäämisellä selvitettiin etenkin muokattujen proteiinien sijoittumista soluissa. Proteiinien paikallistamiseen soluissa hyödynnettiin vasta-aineita. Primaarisena vasta-aineena käytettiin HA-sekvenssin tunnistavaa hiiren anti-HA-vasta-ainetta ja sekundaarisena fluoresoivaa hiiren Alexa 488 -vasta-ainetta. Transfektoituneiden solujen määrä oli mikroskooppitarkastelulla noin 30-40 % soluista. Soluja mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla. Mikroskooppikuvat ovat läpivalaisukuvia, joten ne eivät ota huomioon solun kolmiulotteisuutta. Lämpileikkauksilla voitaisiin varmistua proteiinin sijoittumisesta solussa.

Kuvassa 13 nähdään kaksi fluoresenssimikroskooppikuvaa täysipitkän LBR-proteiinin sijoittumisesta NIH-soluissa. Tuman reuna on soluissa vahvemmin värjäytynyt eli voidaan todeta, että proteiinit ovat sijoittuneet sinne. Tuman keskusta on myös värjäytynyt, mutta signaali on selvästi heikompaa kuin tuman reunalla.



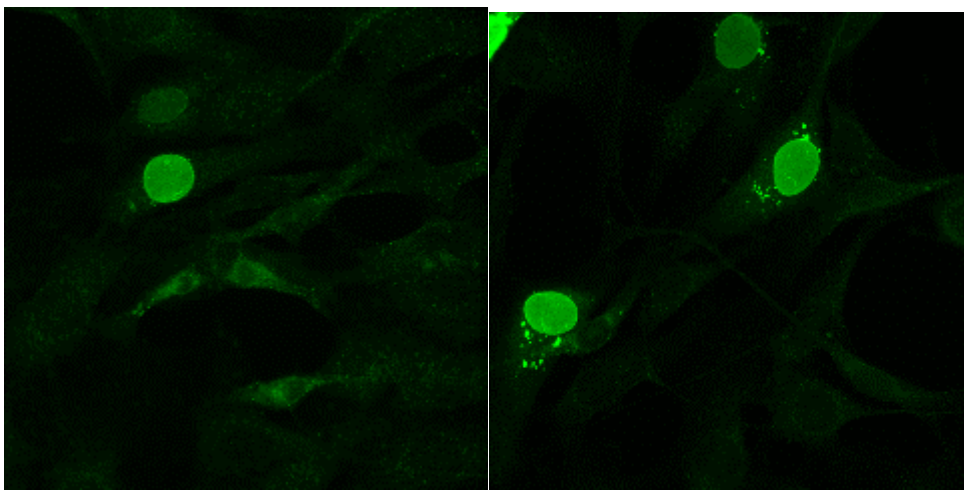
Kuva 13 Fluoresenssimikroskooppikuvia täysipitkän LBR-proteiinin sijoittumisesta NIH-soluissa

Kuvassa 14 nähdään fluoresenssimikroskooppikuva muokatusta LBR-proteiinista. Tuman sisäinen signaali on selvästi voimakkaampi kuin kuvassa 13. Tästä voidaan todeta, että proteiini kulkeutuu tumaan eikä jää solulimaan. Muokatulta proteiineilta puuttuu transmembraanidomeeni, mikä estää niiden kiinnittymisen sisemmälle tumakalvolle ja mahdollistaa niiden tuman sisäisen paikantumisen. Tumassa voidaan havaita tummempia alueita, joissa ei ole LMB-signaalia. Nämä ovat todennäköisesti tumajyväsiä. Niitä esiintyy pääasiassa solunjakautumisen välivaiheen aikana. Niiden tehtävänä on tuottaa rakenneosat proteiineja tuottavia ribosomeja varten.



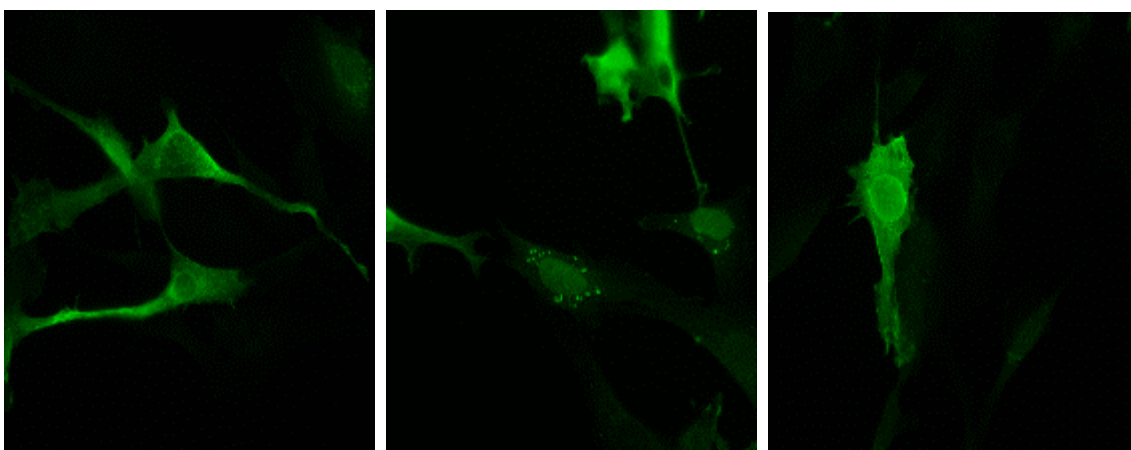
Kuva 14 Fluoresenssimikroskooppikuva muokatun LBR(1-211)-proteiinin sijoittumisesta NIH-solussa

Kuvassa 15 on täyspitkän Lap2E-proteiinin ilmeneminen solussa. Fluoresenssimikroskooppikuvien tarkastelulla signaali on soluissa voimakkaampaa tuman reunoilla, kuten kuvassa 13. Proteiinit sijoittuvat siis ainakin osittain tumalevylle, koska niillä on sen mahdollistava domeeni. Tuman ulkopuolella solussa on myös värjäytyneitä pisteitä, joten proteiini paikantuu osittain myös solulimaan.



Kuva 15 Fluoresenssimikroskooppikuvia täyspitkän Lap2E-proteiinin sijoittumisesta NIH-soluissa

Fluoresenssimikroskooppikuvat Lap2E-proteiinin muokatusta muodosta Lap2E(1-409) esitellään kuvassa 16. Nähdään, että proteiini paikantuu niin tumaan kuin solulimaankin. Lap2E(1-409)-proteiini on kooltaan isompi kuin LBR(1-211), joten tämä voi vaikuttaa proteiinin sijoittumispaikkaan solussa.



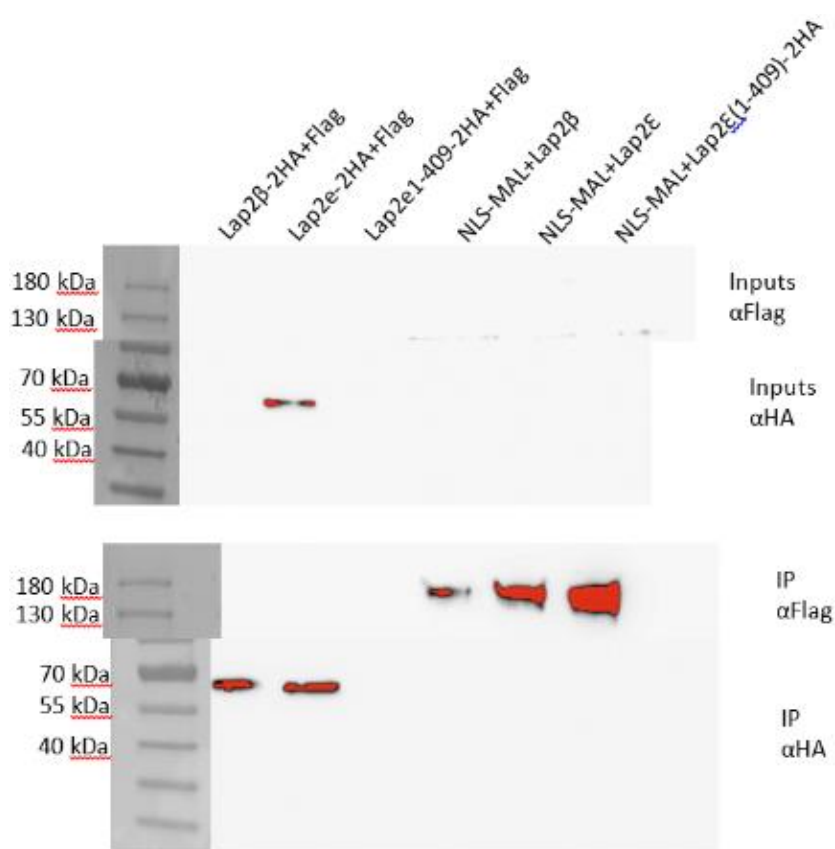
Kuva 16 Fluoresenssimikroskooppikuvia muokatun Lap2E(1-409)-proteiinin sijoittumisesta NIH-soluissa

5.5 Immunosäostuksen Western blot -tulokset

Immunosäostuksen avulla tutkittiin laminaproteiinien ja transkriptiotekijä MAL:n välisiä vuorovaikutuksia. Niin kutsutut input-näytteet sisältävät kaikki solulysaatissa ilmenevät proteiinit, joista vasta-aineen avulla havaitaan tutkittavat proteiinit. IP-näytteet ilmentävät vain immunosäostuksessa agarosihelmiin sitoutuneita vasta-aineen avulla havaittavia proteiineja ja niiden muodostamia komplekseja. Tulokset saatiin Western blottausten avulla, kuvaamalla nitroselluloosakalvot FUJIFILM-3000-laitteella.

5.5.1 Lap2E-proteiinin vuorovaikutuksen tutkiminen NLS-MAL-proteiinin kanssa

Lap2- ja MAL-proteiinien vuorovaikutusta tutkittiin käyttämällä immunosaostuksessa FLAG-agarosihelmiä. Niiden avulla saatiin rikastettua näytteissä ilmenevät NLS-MAL-muodot. Anti-FLAG-vasta-aineella MAL saatiin Western blottauksessa esille. Lap2E-proteiinin mahdollista sitoutumista transkriptiotekijä MAL:iin tutkittiin anti-HA-vasta-aineen avulla. Ihmisen Lap2 β -proteiinia käytettiin kontrollina, koska siitä oli jo aikaisempaa tutkimustietoa. Kuvassa 17 nähdään solulysaattien (input-näytteet) sekä immunopresipitaationäytteiden Western blotit.



Kuva 17 Western blot -tulokset, kun Lap2- ja MAL-proteiinien vuorovaikutusta tutkittiin käyttämällä immunosaostuksessa FLAG-agarosihelmiä ja signaalien paikantamiseen anti-FLAG- ja anti-HA-vasta-aineita

Kuvasta 17 nähdään, että input-näytteet eivät muodosta yhtään signaalia, kun vasta-ainereaktiossa käytettiin anti-FLAG:ia. Voidaan todeta, että transfektoidun MAL:n määrä soluissa on vähäistä. Anti-HA-vasta-aineella input-näytteissä nähdään vain yksi signaali kontrollinäytteen Lap2E-proteiinin kohdalla. Voidaan todeta, että proteiini ilmenee soluissa ainakin yksinään. Solulysaattinäytteiden perusteella voidaan sanoa, että solut eivät tuota Lap2 β - ja Lap2E(1-409)-proteiineja tai niiden tuotto on vähäistä. Jo proteiinien

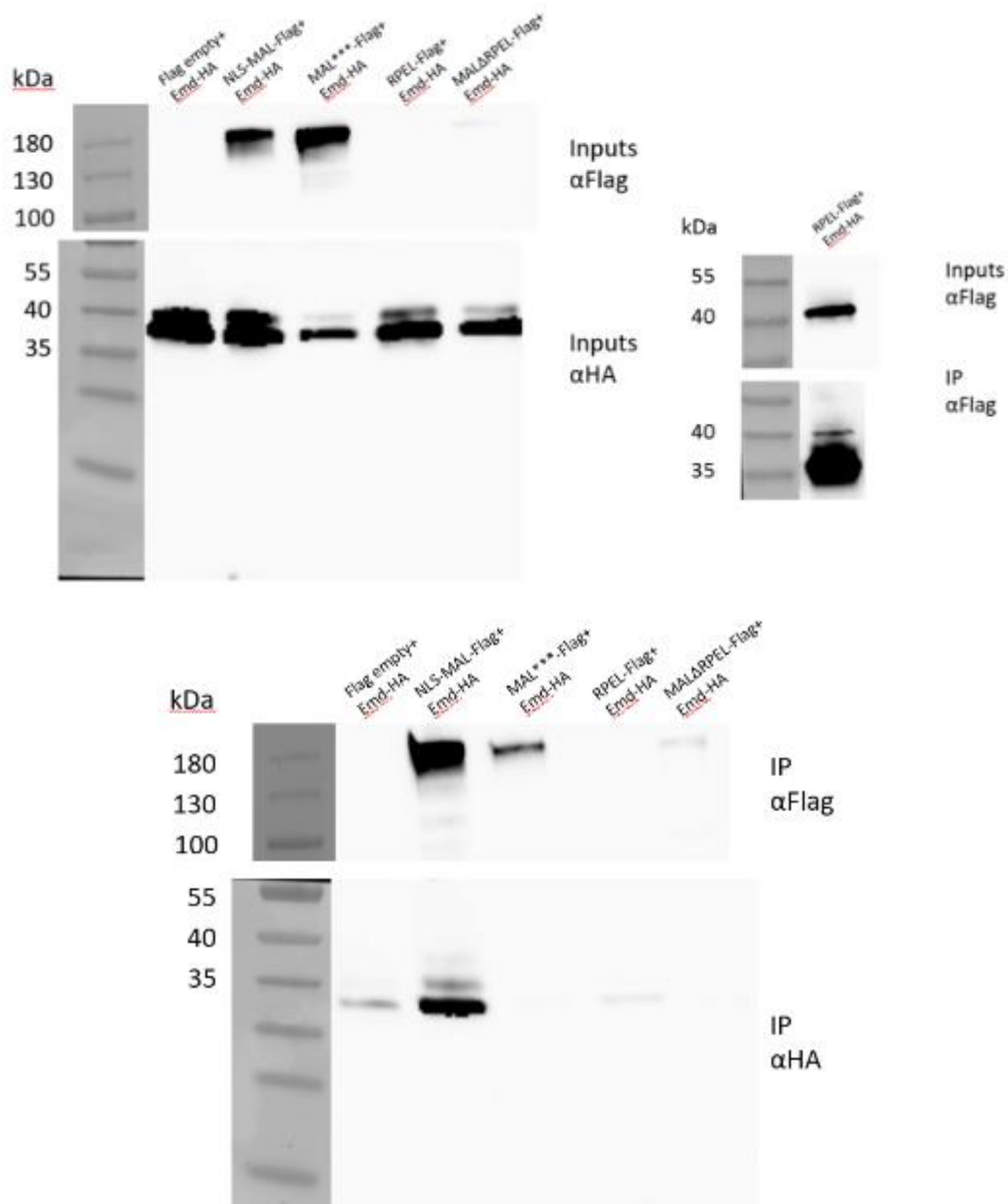
ilmenemistasonmäärittelyksellä nähtiin (kuva 12), että Lap2 ϵ (1-409):n tuotetaan soluissa erittäin heikosti. Lap2 β :sta on tutkimustietoa ja se on ilmennyt tutkimusryhmän aikaisempien tutkimuksien mukaan hyvin soluissa.

Kun signaalien havaitsemiseen käytettiin anti-FLAG-vasta-ainetta, immunosaostusnäytteiden negatiiviset kontrollinäytteet eivät muodostaneet signaaleja. Varsinaiset näytteet muodostavat selkeät signaalit noin 170 kDa kohdalle. MAL-proteiinia ilmenee siis soluissa ja kiinnittyy agaroosihelmiin. Anti-HA-vasta-aineella IP-näytteissä muodostui näkyvät signaalit Lap2 β - sekä Lap2 ϵ -näytteiden kohdalle, kun näytteet transfektoitiin soluihin tyhjän FLAG-vektorin kanssa. Nämä kuvaavat epäspesifistä sitoutumista FLAG-helmiin. Varsinaisissa näytteissä ei nähdä muodostuneita signaaleja.

Vertailemalla varsinaisten näytteiden immunopresipitaatiotuloksia anti-HA- ja anti-FLAG-vasta-aineissa voidaan arvioida Lap2- ja NLS-MAL-proteiinien välistä vuorovaikutusta. Kuvan 17 IP-näytteiden perusteella nähdään, että MAL:ia muodostuu soluissa ja se kiinnittyy FLAG-helmiin. Kun käytettiin anti-HA-vasta-ainetta, näytteet eivät muodostaneet signaaleja. Tämän perusteella Lap2-proteiini ei siis kiinnity MAL:iin. Input-näytteiden perusteella nähdään kuitenkin, että Lap2-proteiinien tuotto on vähäistä tai niitä ei jostain syystä tuoteta ollenkaan soluissa. Tästä syystä proteiinien vuorovaikutussuhteista ei voida tämän kokeen perusteella sanoa mitään.

5.5.2 Emeriinin ja MAL:in välinen vuorovaikutus

Emeriinin ja MAL-proteiinin eri muunnelmien vuorovaikutusta tutkittiin ensin anti-FLAG-agaroosihelmien avulla. Kuvassa 18 on Western blottaukset solulysaateista sekä immunopresipitaationäytteistä, kun immunosaostuksen avulla rikastettiin näytteistä MAL-proteiini ja vasta-aineena sen havaitsemiseen käytettiin anti-FLAG:ia. Emeriinin mahdollista kiinnittymistä MAL:iin tutkittiin anti-HA-vasta-aineen avulla.



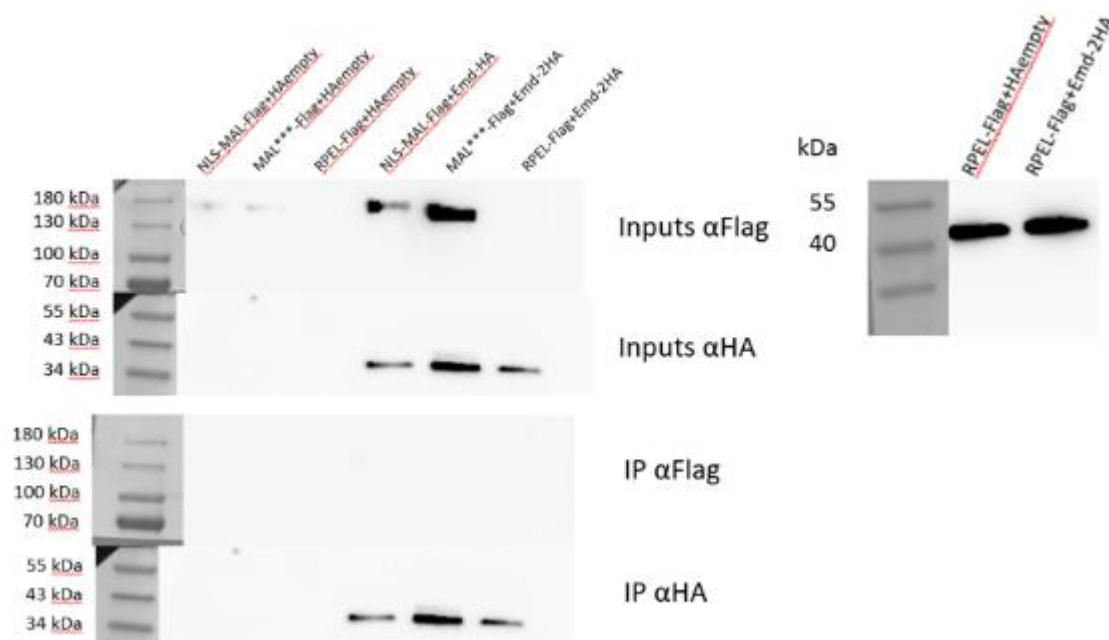
Kuva 18

Western blot-tulokset, kun emeriinin ja MAL-proteiinin vuorovaikutusta tutkiessa immunosaostuksessa käytettiin FLAG-agaroosihelmiä ja signaalien paikantamiseen anti-FLAG- ja anti-HA-vasta-aineita.

Kun solulysaatti- eli input-näytteiden muodostamien signaalien havaitsemiseen käytettiin anti-FLAG-vasta-ainetta, voidaan todeta, että MAL-proteiinin kaikki muodot ilmenevät soluissa. MAL Δ RPEL-muoto ilmenee kuitenkin heikompana kuin muut proteiinit. Input-näytteet osoittavat anti-HA-vasta-aineella muodostuvien signaalien perusteella, että myös emeriinia tuotetaan soluissa hyvin.

Immunopresipitaationäytteiden muodostamien signaalien avulla anti-FLAG-vasta-aineella nähdään, että kaikki MAL-proteiinin muunnelmat saadaan rikastettua agaroosihelmien avulla solulysaateista. Mahdollista emeriinin kiinnittymistä MAL:iin tutkittiin anti-HA-vasta-aineen avulla. IP-näytteissä negatiivinen kontrolli (Flag-empty + Emd-HA) muodostaa heikon signaalin, joka kuvaa agaroosihelmien ja emeriinin välillä olevaa epäspesifisistä sitoutumista. Heikko signaali nähdään myös emeriinin ja RPEL-näytteen kohdalla, mutta tätä voidaan negatiivisen kontrollinäytteen tuloksen perusteella pitää epäspesifisyytenä. Sen sijaan emeriinin ja NLS-MAL-näytteen kohdalla on selvä vahva signaali, jota voidaan pitää merkinä vuorovaikutuksesta. Anti-HA-vasta-aineella immunopresipitaationäytteiden muodostamien signaalien perusteella voidaan todeta, että emeriini kiinnittyy MAL-NLS-proteiiniin eli niiden välillä on mahdollista vuorovaikutusta.

Emeriinin ja MAL-proteiinin välistä vuorovaikutusta tutkittiin myös rikastamalla ensin HA-sekvenssin sisältävä emeriini solulysaateista anti-HA-affiniteettigeelin avulla. MAL:n kiinnittymistä emeriiniin tutkittiin anti-FLAG-vasta-aineella. Kuvassa 19 on ns. input-näytteiden ja immunosaostuksen tulokset, kun proteiinit olivat yli-ilmentyneitä soluissa.



Kuva 19 Western blot -tulokset, kun emeriinin ja MAL:n vuorovaikutusta tutkiessa immunosaostuksessa käytettiin anti-HA-affiniteettigeeliä ja signaalien paikantamiseen anti-FLAG- ja anti-HA-vasta-aineita.

Proteiinien välistä vuorovaikutusta tutkittiin MAL-proteiinin muunnelmilla ja emeriinilla transfektoiduilla soluilla. Kontrollinäytteinä käytettiin MAL:n muunnelmia tyhjän HA-vektorin kanssa. Niiden avulla varmistettiin, että epäspesifistä sitoutumista agarosihelmiin ei tapahdu. Kuvassa 19 input-näytteissä nähdään heikot signaalit kontrollinäytteissä NLS-MAL- ja MAL***-näytteiden kohdalla, kun vasta-aineena käytettiin anti-FLAG:ia. MAL-proteiini ilmenee siis soluissa yksinään ilman emeriinia. Myös varsinaisten näytteiden NLS-MAL- ja MAL***-proteiinien kohdalla nähdään signaalit, mutta vahvempina kuin kontrollinäytteissä. Kuvan perusteella MAL-proteiinin määrä soluissa kasvaa emeriinin läsnä ollessa. Kuvassa 19 on RPEL-näytteen input-näytteiden tulokset anti-FLAG-vasta-aineella. Molemmissa näytteissä muodostuu selkeät signaalit, joten MAL-proteiinista muokattua RPEL-muotoa tuotetaan myös soluissa. Anti-HA-vasta-aineella input-näytteiden muodostamista signaaleista nähdään, että myös emeriinia tuotetaan soluissa hyvin.

Kun käytettiin anti-HA-vasta-ainetta, immunosaostusnäytteet muodostavat selkeät signaalit noin 43 kDa kohdalle. IP-tulosten avulla nähdään, että emeriini kiinnittyy immunosaostuksessa käytettyyn anti-HA-affiniteettigeeliin. Anti-FLAG-vasta-aineella signaaleja ei IP-näytteissä muodostu. Negatiiviset kontrollinäytteet eivät muodosta signaalia, joten havaittavaa epäspesifistä sitoutumista agaroosihelmien ja MAL:n välillä ei ole. Varisinaisten näytteiden perusteella voidaan todeta, että näytteistä HA-affiniteettigeelillä rikastettuun emeriiniin ei ole kiinnittynyt MAL-proteiinia. Voidaan todeta, että vuorovaikutusta ei ole myöskään emeriinin ja RPEL-muodon välillä.

6 Yhteenveto

Projektin tavoitteena oli selvittää transkriptiotekijä MAL:n sekä tumalevyproteiinien Lap2E, LBR ja emeriinin välistä vuorovaikutusta immunosaostustekniikalla. LBR-, LBR(1-211)- ja emeriini-proteiinia koodaavat plasmidit 2HA-C1-vektorissa olivat jo tutkimusryhmän käytössä projektia aloittaessa. Lap2:sta käytettiin hiiren Lap2E-isoformia, josta haluttiin erottaa sisemmällä tumakalvolla kiinni oleva osa. PCR-reaktion avulla monistettiin spesifisillä alukkeilla siis proteiinin 1-409 aminohappoja koodaavaa sekvenssi. Insertistä tehtiin pENTR-vektori liittämällä se TOPO-vektoriin ja Gateway-kloonauksella insertti liitettiin HA- ja FLAG-destinaatiovektoreihin.

Tutkittavien proteiinien ilmenemistason määrittämisellä ja värjättyjen solujen mikroskopimisella haluttiin varmistaa solujen kyky tuottaa muokattuja ja täysipitkiä LBR- ja Lap2E-proteiineja. Tulosten perusteella voitiin varmistua, että solut kykenevät tuottamaan muokattuja proteiineja mutta selkeästi matalammalla tasolla kuin niiden normaaleja muotoja. Muokatuissa proteiineissa on poistettu transmembraanidomeenit, jotka mahdollistavat niiden kiinnittymisen tuman sisemmälle kalvolle. LBR-proteiinilla näitä on kahdeksan ja Lap2E-proteiinilla vain yksi. Näiden sekvenssien puuttuminen aiheuttaa muutoksen proteiinien sijoittumisessa solussa, jolloin ne voidaan virheellisesti tulkita häiriötekijöiksi. Solut voivat pyrkiä luonnollisella toiminnallaan mahdollisesti tuhoamaan ne. Solujen proteiinikompleksit, proteasomit hajottavat muun muassa väärin laskostuneita proteiineja. Myös pienet pyöreät organelit, lysosomit hajottavat solulimassa olevia proteiineja. [22] Näiden mekanismien toiminta voisi selittää muokattujen proteiinien matalan esiintymistason soluissa. On myös mahdollista, että solut eivät kykene tuottamaan muokattuja pro-

teineja yhtä tehokkaasti kuin proteiinien normaalimuotoja. Geenien ilmentymisen voimakkuus saattaa myös vaihdella ajallisesti soluissa eri kasvuvaiheissa, jolloin saadaan eri tuloksia eri aikapisteissä.

Solujen värjäyksellä varmistettiin, minne tuotettavat proteiinit sijoittuvat solussa. Transmembraanidomeenin sisältävät proteiinit sijoituivat tuman kalvolle ja muokatut proteiinit sekä solulimaan että tumaan. LBR(1-211)-proteiini, joka on kooltaan pienempi kuin Lap2 ϵ (1-409) sijoittui pääasiassa tumaan. Lap2 ϵ (1-409)-proteiini ilmeni soluissa sekä tumassa että solulimassa. Lap2 ϵ (1-409) ilmentyminen solulimassa voi johtua sen suuremmasta koosta verrattuna LBR:ään, jolloin sen kuljettaminen tumaan on osittain estynyt. Lap2 ϵ -proteiinin luonnollisella muodolla on vain yksi transmembraanidomeeni, joka puuttuu muokatulta versiolt. LBR:llä on puolestaan kahdeksan transmembraanidomeenia, joiden puuttuminen muokatulta versiolt vaikuttaa todennäköisesti enemmän proteiinin sijoittumiseen solussa. Yleisesti voidaan siis todeta, että proteiinien sijoittumiseen soluissa vaikuttaa niiden koko, muoto sekä muut rakenteelliset ominaisuudet. Lämpileikkauksmikroskopointitekniikalla, kuten konfokaali tai läpäisyelektronimikroskooppitekniikalla (Transmission Electron Microscope), oltaisiin saatu varmempaa tietoa proteiinien sijoittumisesta. Molemmat tekniikat perustuvat näytteen kuvaamiseen optisina tasoina, joista voidaan koota tarkka kolmiulotteinen kuva.

Esikokeiden jälkeen voitiin alkaa tutkia transkriptiotekijä MAL:n ja haluttujen proteiinien välistä vuorovaikutusta immunosaostuksella. Proteiinien välisiä vuorovaikutuksia tutkittaessa proteiinit olivat yliekspressoituneita, jotta saataisiin selkeämpiä tuloksia. MAL:n ja Lap2:n vuorovaikutusta tutkittiin, vaikka solujen kyky tuottaa Lap2 ϵ (1-409):a oli matala. Varmempia tuloksia vuorovaikutuksesta saadaan, kun muokattujen proteiinien tuottoa soluissa saadaan kasvatettua. Lap2 ϵ - ja MAL-proteiinien välistä vuorovaikutusta tutkittiin erilaisten muunnelmien avulla, mutta vuorovaikutusta ei havaittu. Kuvien perusteella MAL sekä Lap2 ϵ ilmenevät soluissa yksinään, mutta Lap2 β - ja Lap2 ϵ (1-409)-proteiinit eivät ilmene ollenkaan. Aikaisempien tutkimusten perusteella solut kuitenkin kykenevät tuottamaan Lap2 β ja matalalla tasolla myös Lap2 ϵ (1-409):a. Lap2:n ja MAL:n välisestä vuorovaikutuksesta ei voida siis näiden tutkimusten perusteella sanoa mitään.

Myös LBR-proteiinia ja siitä muokatun LBR(1-211)-muodon sekä MAL:n vuorovaikutusta tutkittiin. Western blottauksella ei saatu kuitenkaan näkyviä signaaleja input- eikä IP-näytteisiin. Joko proteiineja ei saatu tuotettua soluissa tai ne eivät jostain syystä kiinnittyneet käytettävissä oleviin agaroosihelmiin. Kuvan 10 perusteella nähdään, että solut

kuitenkin kykenevät proteiinien tuottoon. LBR(1-211):n ilmeneminen on kuitenkin erittäin vähäistä. Joten myöskään LBR:n ja MAL:n välisestä vuorovaikutuksesta ei saatu tietoa.

Emeriini ja MAL-proteiinin välistä vuorovaikutusta tutkittiin rikastamalla vuorollaan MAL ja emeriini, sekä tutkimalla toisen proteiinin mahdollista kiinnittymistä vasta-aineen avulla. Rikastamalla ensin anti-FLAG-agaroosihelmillä MAL solulysaatista, saatiin signaaleja MAL-NLS:n ja emeriinin välillä olevasta vuorovaikutuksesta. Vuorovaikutusta tutkittiin myös Anti-HA-agaroosihelmien avulla rikastamalla emeriini, mutta vuorovaikutusta MAL:in kanssa ei tällöin havaittu.

Immunosaostus on tekniikkana monivaiheinen, mikä lisää riskiä tulosten virheellisyyteen. Analyysi pitäisi toistaa useaan kertaan samoissa olosuhteissa sekä saada samoja tuloksia, jotta voitaisiin tehdä varmoja johtopäätöksiä proteiinien välisestä vuorovaikutuksesta. Tekniikka on kuitenkin halpa ja nopea sekä helposti toistettava, minkä vuoksi sitä käytetään. Tekniikka on hyvä, kun halutaan tietoa tiettyjen proteiinien välisestä suhteesta, mutta seulontamenetelmänä tämä ei toimi. Positiiviset tulokset eivät aina kerro suorasta vuorovaikutuksesta, vaan proteiinien välillä saattaa olla siltamolekyyliä, kuten toisia proteiineja, nukleiinihappoja (DNA, RNA) tai muita molekyylejä [23].

Proteiinien välistä vuorovaikutusta voitaisiin tutkia myös esimerkiksi massaspektrometrin avulla, jolloin proteiineja analysoitaisiin moolimassan avulla. Kehittyvä sirutekniikka avaa myös uusia mahdollisuuksia tutkimusmaailmassa proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen [24]. Leimansiirtomenetelmä proteiinien välillä (Label transfer protein interaction Analysis) voisi olla toimiva vuorovaikutuksia tutkittaessa. Menetelmä pystyy havaitsemaan ohimeneviä ja heikkojakin vuorovaikutuksia, jotka usein jäävät immunosaostuksella havaitsematta. Menetelmässä toinen tutkittavista proteiineista reagoi Label Transfer-reagenssin (LTR) kanssa. LTR:ään on kovalenttisesti sitoutunut radioaktiivinen, fluoresoiva tai biotiinileima. Tämä proteiinin ja LTR:n yhdistelmä on vuorovaikutuksessa toisen tutkittavan proteiinin kanssa, jolloin muodostuu mahdollinen kompleksi. UV-valon avulla aktivoidaan LTR:n valoreaktiivinen ryhmä, jolloin leima sitoutuu kovalenttisesti toiseen proteiiniin ja lopulta ensimmäinen proteiineista irtoaa kompleksista. Western blotauksen, sekvenssitarkastelun tai massaspektrometrin avulla voidaan havaita tämän leiman siirtyminen ja analysoida proteiinien välistä vuorovaikutusta. [25.]

Projektin aihe oli vaativa ja laaja, mutta erittäin mielenkiintoinen. Kokonaisuuden ymmärtäminen vaati perehtymistä MAL:iin ja tumalevyproteiineihin sekä niiden merkitykseen

solussa. Jos aikaa olisi ollut enemmän, olisi tehty useita toistoja immunosaostuksessa. Tulosten laatua voisi parantaa optimoimalla esimerkiksi transfektiossa DNA:n sekä jetPRIME-reagenssin määriä. Jos tutkittavien proteiinien ilmeneminen vaihtelee eri kasvuvaiheissa, vuorovaikutussuhteita voisi tutkia muuttamalla solujen inkubointiaikaa. Immunosaostuksessa optimointia voisi tehdä agaroosihelmien ja vasta-ainemäärien suhteen. Proteiinien leimaaminen erilaisilla tunnistussekvensseillä, tuottamalla proteiineja eri solulinjoissa ja eri organismista olevien tumalevyproteiinien vertaileminen immunosaostuksessa, voisi myös olla tutkimuksien kannalta hyödyllistä.

Lähteet

- 1 Tieteen termipankki. Verkkosivu (muokattu 5.12.2014) <<http://tieteentermi-pankki.fi/wiki/Nimitys:transkriptiofaktori>> [Viitattu 21.6.2016]
- 2 Kaisa Rajakylä. 2015. The Nuclear import Mechanism of SRF Co-Activator MKL1. Helsinki: Hansaprint
- 3 National Center for Biotechnology Information. Verkkosivu. Päivitetty 3.6.2016. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6722>> [Viitattu 7.7.16]
- 4 Wang DZ, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schratt G, Richardson JA, Nordheim A, Olson EN. 2002. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardinrelated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14855-14860
- 5 Esnault C, Stewart A, Gualdrini F, East P, Horswell S, Matthews N, Treisman R. 2014. Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblast. *Genes Dev* 28: 943-958
- 6 Rafal Pawlowski, Eeva Kaisa Rajakylä, Maria K Vartiainen, Richard Treisman. 2010. An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *The EMBO Journal* 29, 3448-3458
- 7 Maria K Vartiainen, Sebastian Guettler, Banafshe Larijani, Richard Treisman. 2007. Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL, *VOL 316 Science*
- 8 Francesc Miralles, Guido Posern, Alexia-Ileana Zaromytidou and Richard Treisman. 2013. Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL, *Cell*, Vol. 113, 329-342.
- 9 Sebastian Guettler, Maria K. Vartiainen, Francesc Miralles, Banafshe Larijani and Richard Treisman. 2008. RPEL Motifs Link the Serum Response Factor Cofactor MAL but not Myocardin to Rho Signaling via Actin Binding, *Mol. Cell. Biol.* vol. 28 no. 2 732-742
- 10 Arnaud Descot, Monika Rex-Haffner, Genevieve Courtois, Dominique Bluteau, Antje Menssen, Thomas Mercher, Olivier A. Bernard, Richard Treisman, Guido Posern. 2008. OTT-MAL Is a Deregulate Activator of Serum Response Factor-Dependent Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* vol. 28 no 20 6171-6181
- 11 Pekka Taimen, Hannu Kalimo ja Markku Kallajoki. 2004. Tuman lamiinit ja niihin liittyvät taudit, *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*; 120(7):799-805
- 12 Solunetti. Verkkosivu. 2006. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tumakotelo/>> [Viitattu 12.6.2016]

- 13 Roland Foisner. 2001. Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina, *Journal of Cell Science* 114
- 14 Roland Foisner. *Dynamic Connections of Nuclear Envelope Proteins to Chromatin and the Nuclear Matrix*, Landes Bioscience; 2000-2013
- 15 Verkkosivu. <<https://prescottgenomics.wikispaces.com/What+is+the+LMNA+Gene%3F>> [Viitattu 8.6.16]
- 16 Mileidy W. Gonzalez, Maricel G. Kann. 2012. Protein interactions and disease. <<http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1002819>> [Viitattu 5.7.2016]
- 17 Yanjun Qi. 2008. *Learning of Protein Interaction Networks*. (s.9-12) <https://www.cs.cmu.edu/~qyj/paper_CMU/qyj-disertation-v17-final.pdf> [Viitattu 23.6.2016]
- 18 Chin Yee Ho, Diana E. Jaalouk, Maria K. Vartiainen, Jan Lammerding. 2013. Lamin A/C and emerin regulate MKL1/SRF activity by modulating actin dynamics, *Nature* 497, 507-511
- 19 User guide. Revision Date 29 March 2012. pENTR™ Directional TOPO Cloning Kits, Invitrogen
- 20 User Guide. 2003.Gateway® Technology, Invitrogen
- 21 Sigma Aldrich. Verkkosivu. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/12013819001?lang=fi®ion=FI&gclid=CKH0sIHOys4CFYUNcwodYI4OOA>> [Viitattu 10.8.2016]
- 22 Solunetti. Verkkosivu. 2006. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/lysosomi/>> [Viitattu 31.7.2016]
- 23 Verkkosivu. 2016. <https://en.wikipedia.org/wiki/Methods_to_investigate_protein%E2%80%93protein_interactions> [viitattu 1.8.2016]
- 24 Olli Kallioniemi. 2002. Geenisiruista biosiruihin: uuden biotekniikan haasteet ja mahdollisuudet. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*; 118(11):1149-1156
- 25 Thermo Scientificin verkkosivu. 2015. <<https://www.thermo-fisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/label-transfer-protein-interaction-analysis.html>> [Viitattu 1.9.2016]

Liite 1 Projektissa käytetyt liuokset

Projektissa käytettyjen liuosten ohjeet on otettu Helsingin yliopiston Biotekniikan Instituutin elatuskeittiön verkkosivuilta.

Dulbecco 10 l

Liuos A:

Taulukko 1

1.0 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	MERCK 5833
1.0 g	CaCl ₂	MERCK 2083
	Ad. 5 l MilliQ H ₂ O	

Liuos B: (=1 litra 10xPBS:ää)

Taulukko 2

80 g	NaCl	RIEDEL 31434
2 g	KCl	RIEDEL 31248
14 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	J.T.BAKER 0326
2 g	KH ₂ PO ₄	J.T.BAKER 0241
	Ad. 3 l MilliQ H ₂ O	

- Liuokset A ja B liuotetaan erikseen.
- Liuokset yhdistetään 10 litraksi
- Liuos steriilisuodatetaan (90 mm, 0,22mm)

LB-AGAR

Taulukko 3

9 g	Tryptone	HISPANLAB H1612
4.5 g	Yeast extract	HISPANLAB H1702
13.5 g	Agar	HISPANLAB H1800
4.5 g	NaCl	RIEDEL 31434
	ad. 900 ml MilliQ H ₂ O	

- Punnitaan kaikki aineet suoraan pulloon
- Liuotetaan ja autoklavoidaan
- Säilytys +4 °C:ssa
- Antibioottimaljoissa sulatettu LB-agar jäädytetään vesihauteessa +55 °C:een ja lisätään tarvittava määrä antibioottia halutun konsentraation saamiseksi

4 % PFA

Taulukko 4

40 g	PFA (Paraformaldehydi)	J.T.BAKER 1157
------	------------------------	----------------

- Lisätään lämmintä ja kylmää steriiliä 1xPBS:ää ~900 ml. Liukenee 60 °C:ssa. Ei kuitenkaan anneta lämmetä yli 65 °C:seen (leimahdusvaara). Täytetään litraksi.
- Suojaudutaan (nitriilihanskat ja hengityssuoja), kun punnitaan ja käsitellään PFA:ta.
- Työ tehdään vetokaapissa.
- Suodatetaan vesi-imulla.

1 x PBS (Phosphate-buffer saline)

Taulukko 5

8,0 g	NaCl	RIEDEL 31434
0,2 g	KCl	RIEDEL 31248
1,4 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	J.T.BAKER 0326
0,2 g	KH ₂ PO ₄	MERCK 4871
	ad. 1000 ml MilliQ H ₂ O	

- Liuos autoklavoidaan
- Säilytetään huoneenlämmössä

10 x Running-buffer (10 x Laemmli)

Taulukko 6

30 g	Tris	ICN 819638
144 g	Glycine	MERCK 4201
10 g	SDS	GIBCO 15525-017
	ad. 1000 ml MilliQ H ₂ O	

- Ei steriloida. Säilytetään huoneenlämmössä.

SOB-medium

Taulukko 7

20 g	Tryptone	HISPANLAB H1612
5 g	Yeast extract	HISPANLAB H1702
0.58 g	NaCl	RIEDEL 31434
0.19 g	KCl	RIEDEL 31248
2.03 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	MERCK 5833
2.46 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	MERCK 5886
	ad. 1000 ml MilliQ H ₂ O	

- Liuoksen pH:n tulee olla 6.8-7.8. (ei tarvitse säätää)
- Liuos autoklavoidaan
- Säilytys +4 °C:ssa

SOC

Taulukko 8

500 ml	SOB (autoklavoidaan) (taulukko 2)	
10 ml	20 % glucose (autoklavoidaan)	ICN 194672

- Säilytys +4 °C:ssa

10xTE pH 7,5

Taulukko 9

33,3 ml	3 M Tris-HCl pH 7,5
20 ml	0,5 M EDTA pH 7,5
	ad. 1000 ml MilliQ H ₂ O

- Tarkistetaan liuoksen pH ja säädetään tarvittaessa 5 M HCl:lla (~600 ml, lähtö pH 7,63) tai NaOH:lla.
- Liuos autoklavoidaan
- Säilytetään huoneenlämmössä